

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОВАЛЕНКО ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 615.28/281:616.155.32

ДИСЕРТАЦІЯ

АНТИМІКРОБНА ДІЯ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ФТОРХІНОЛОНІВ І ЇХ
ВПЛИВ НА АРГІНАЗА/NO-СИНТАЗНУ ТА АНТИОКСИДАНТНУ
СИСТЕМИ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ

091 Біологія
(03.00.04 – біохімія)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають постилання на відповідне джерело
_____ І.В. Коваленко

Науковий керівник – Воробець Зіновій Дмитрович,
доктор біологічних наук, професор

ЛЬВІВ – 2020

АНОТАЦІЯ

Коваленко І.В. «Антимікробна дія декаметоксину та фторхінолонів і їх вплив на аргіназа/NO-синтазну та антиоксидантну системи лімфоцитів крові» - кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (03.00.04 – біохімія). – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2020.

Дисертацію присвячено вивченню антимікробної дії антисептика декаметоксину та антибіотиків фторхінолонового ряду та їх впливу на аргіназа/NO-синтазну та антиоксидантну системи лімфоцитів крові людини.

Показано, що декаметоксин (ДКМ) і його лікарська форма декасан (ДС) проявляли однакову мікробоцидну активність щодо музейних штамів *E. coli* (15,62 мкг/мл), *C. albicans* (16 мкг/мл), *E. faecalis* (0,97 мкг/мл), *Bac. subtilis* (0,24 мкг/мл). ДС був менш мікробоцидно активним щодо *S. aureus* (0,48 мкг/мл) у порівнянні з ДКМ (0,24 мкг/мл). Також ДС був менш мікробоцидно активним щодо *P. aeruginosa* (250 мкг/мл), ніж ДКМ (62,5 мкг/мл).

Аналіз результатів дослідження чутливості клінічних штамів мікроорганізмів до ДКМ та ДС показав високу бактерицидну дію на штами *S. epidermidis* (від $(1,16 \pm 0,14)$ до $(1,45 \pm 0,15)$ мкг/мл); *S. aureus* (від $(1,19 \pm 0,59)$ до $(1,52 \pm 0,67)$ мкг/мл); *E. coli* (від $(15,62 \pm 1,3)$ до $(18,46 \pm 1,8)$ мкг/мл); *P. Aeruginosa* (від $(36,5 \pm 7,91)$ до $(39,48 \pm 6,85)$ мкг/мл), фунгіцидну дію на *C. albicans* (від $(13,39 \pm 1,12)$ до $(15,63 \pm 1,13)$ мкг/мл). Таким чином, обидва препарати, ДКМ і ДС мікробоцидно діють на стафілококи, ентерококи, кишкову паличку та *Candida albicans*. Проте патентований взірець ДКМ за мікробоцидною дією переважає ДС.

На підставі результатів досліджень встановлено, що ДКМ та ДС в різних бактеріостатичних (МБсК) і бактеріоцидних (МБцК) концентраціях суттєво впливають на адгезивну здатність грампозитивних (стафілококи) та

грамнегативних (ешерихії) бактерій. За МБСК антисептиків відсоток адгезованих бактеріальних клітин стафілококів зменшився як за присутності ДКМ, так і за присутності ДС, на 58-59 %. МБСК лікарських антибактеріальних препаратів значно інтенсивніше пригнічували адгезивний процес ешерихій.

Щодо резистентності мікроорганізмів, то встановлено, що штами стафілококів повільно формували стійкість до ДКМ. Після п'яти пасажів резистентність двох штамів стафілококу збільшилась у два рази, а 30-ти кратне пасажування показало, що резистентність до ДКМ у *S. aureus* ATCC 25923 зросла в 64 рази, а в *S. aureus* 27 – у 32 рази. Резистентність до ДКМ у *Candida albicans* формувалася повільно. Так, після 30 пасажів на поживних середовищах у присутності ДКМ, стійкість у *Candida albicans* зросла в 16 разів.

Дослідження формування стійкості до лікарських форм показало, що *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27 формували резистентність до ДС, яка зросла в 4-8 разів (1,95 мкг/мл) після 10 пасажів культивування. Після 30 пасажів зросла в 64 рази, відповідно. Формування резистентності штамів *C. albicans* 14, *C. albicans* 51 до ДС продемонстровано, що їх стійкість збільшилась після 10 пасажу у 8 разів, а після 30 пасажів тест-штами *C. albicans* були в 32 рази стійкішими порівняно з вихідним рівнем.

Таким чином, доведено, що у стафілококів, *C. albicans* повільно формується стійкість *in vitro* до декаметоксину та декасану, яка після 30 пасажів збільшується у 16-64 рази.

В сучасних умовах, доцільним залишається вивчення чутливості *S. aureus* до фторхінолонів, які постійно застосовують в лікуванні важко хворих з гнійно-запальними захворюваннями. За результатами проведених досліджень вперше отримані прогностичні аналітичні вирази динаміки чутливості до фторхінолонів клінічних штамів *S. aureus*, які спричиняли у хворих із важкими опіками гнійно-запальні ускладнення. У клінічних штамів золотистого стафілококу, прогнозована чутливість до ципрофлоксацину, має

тенденцію до зниження, зростає до левофлоксацину. Високою є чутливість *S. aureus* до моксифлоксацину (92,5 %).

Оскільки декаметоксин володіє гідрофільними та ліпофільними властивостями, він через ранові поверхні, слизові оболонки, шкіру, бронхи може проникати в клітини, кров, лімфу, розноситись кров'ю до різних органів і тканин пацієнта і, таким чином, спричиняти різноманітні біохімічні ефекти, зокрема щодо регуляторних NO-синтазної та антиоксидантної систем клітин. У цьому плані біологічна дія декаметоксину практично не досліджена.

Показано, що декаметоксин у концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності. При 10^{-2} М концентрації - в 1,4 раза щодо контрольних значень ($p < 0,05$). При дії на лімфоцити крові фторхінолонів також спостерігається концентраційнозалежне зростання ензиматичної активності аргінази, з виходом на плато. При цьому активність зростала в ряді: контроль $\rightarrow$ ципрофлоксацин $\rightarrow$ левофлоксацин $\rightarrow$ моксифлоксацин. Ці дані прямо корелюють з поколіннями фторхінолонів. Найвища активність спостерігається при дії моксифлоксацину, який належить до IV покоління.

Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази засвідчив, що зростання активності аргінази в лімфоцитах при дії фторхінолонів відбувається за рахунок зростання числа обертів ензиму (V_{max} зростає), хоча спорідненість субстрату до ензиму знижується (K_{L-arg} – зростає).

Оскільки L-аргінін є субстратом не тільки для аргінази, але й для всіх ізоформ NO-синтази, наступним етапом роботи було вивчення активності окремих ізоформ NO-синтази та їх кінетичних особливостей при дії декаметоксину та фторхінолонів.

Показано, що активність конститутивної ізоформи NO-синтази в контролі складала ($71,4 \pm 6,9$), а активність індукцибельної ізоформи ($1,58 \pm 0,18$) нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну. За дії ДКМ в концентрації 10^{-5} М активність cNOS знижувалась в 1,25 раза ($p < 0,05$), а активність iNOS зростала в 10,8 раза ($p < 0,001$).

В результаті проведених досліджень щодо впливу фторхінолонів на активність окремих ізоформ NO-синтази встановлено, що у концентраціях 10^{-5} М моксифлоксацин зумовлює зниження активності cNOS в 10,2 ($p < 0,001$), левофлоксацин – у 5,5 ($p < 0,001$) та левофлоксацин – у 4,2 рази ($p < 0,001$).

При вивченні впливу фторхінолонів на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових жінок, її активації ми не спостерігали, а інгібуючий ефект неможливо було визначити через низьку активність. Для індукування активності iNOS в лімфоцитах крові використовували оксидативний стрес, преінкубуючи лімфоцити з H_2O_2 . Преінкубація лімфоцитів із 0,2 мМ H_2O_2 призводить до зростання активності iNOS в 31,3 рази. На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, ципрофлоксацин призводить до інгібування активності ензиму в 1,2 ($p < 0,05$), левофлоксацин – у 1,4 ($p < 0,05$), а моксифлоксацин – у 2,3 рази ($p < 0,001$).

При дії на організм ксенобіотиків, зокрема ліків у клітинах часто ініціюються окиснювальні вільнорадикальні процеси.

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в лімфоцитах периферичної крові при дії декаметоксину. Показано незначне інгібування процесів ПОЛ за дії різних концентрацій декаметоксину. Так, у контролі концентрація МДА у лімфоцитах крові складає $(62,3 \pm 4,6)$ мкмоль/мг протеїну. При дії різних концентрацій декаметоксину (10^{-5} – 10^{-2} М) ця величина дещо знижується, однак недостовірно ($p > 0,001$). Одночасно з незначним зниженням процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни в активності ензимів системи глутатіону. Так, показано, що в контролі глутатіонпероксидазна активність лімфоцитів складає $(154,2 \pm 13,4)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну. За дії декаметоксину 10^{-2} М ця активність дозозалежно зростає ($p < 0,05$).

Щодо активності глутатіонредуктази, то в контролі вона складала $(51,7 \pm 4,2)$ нмоль NADPH/хв на 1 мг протеїну. При дії декаметоксину в

концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М ця активність дозозалежно зростала, в 1,2 раза ($p < 0,05$).

Глутатіон-S трансферазна активність в контролі складала $(12,2 \pm 9,2)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну. Додавання в інкубаційне середовище декаметоксину в концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М дозозалежно активувало цей ензим, активність якого зростала в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Таким чином, показано, що антисептик декаметоксин суттєво впливає на регуляторні механізми клітини, зокрема лімфоцитів крові, активуючи ензими глутатіонової антиоксидантної системи.

Нами також проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в лімфоцитах периферичної крові при дії фторхінолонів II – IV поколінь. У всіх випадках показано активацію процесів ПОЛ. Так, у лімфоцитах крові контрольної групи концентрація МДА дорівнює $(4,1 \pm 0,4)$ мкмоль/л. При дії ципрофлоксацину (II покоління) процеси ПОЛ інтенсифікуються в 1,7 раза щодо показників у групі контролю ($p < 0,001$). За дії на лімфоцити левофлоксацину (III покоління) процеси ПОЛ ще більше активуються, концентрація МДА зростає в 1,8 раза щодо контрольних значень ($p < 0,001$). Подібна ситуація спостерігається і при визначенні концентрації МДА у лімфоцитах крові при дії моксифлоксацину (IV покоління), який призводить до зростання МДА в 1,9 раза ($p < 0,001$). Можна бачити пряму залежність активації процесів ПОЛ від покоління антибіотиків у ряді: моксифлоксацин > левофлоксацин > ципрофлоксацин

Одночасно з інтенсифікацією процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни і в активності ензимів системи глутатіону. Так, глутатіонпероксидазна активність лімфоцитів при дії ципрофлоксацину зростала в 1,1 ($> 0,05$), при дії левофлоксацину – в 1,2 ($p > 0,05$), а при дії моксифлоксацину – в 1,3 раза ($p < 0,05$). Тобто, достовірне зростання активності глутатіонпероксидази відбувається тільки при дії моксифлоксацину.

Щодо активності глутатіонредуктази, то в лімфоцитах в контролі вона складала $(51,7 \pm 4,2)$ нмоль NADPH/хв на 1 мг протеїну. При дії

ципрофлоксацину вона знижувалась в 1,2 ($p < 0,05$), левофлоксацину – в 1,2 ($p < 0,05$), а при дії моксифлоксацину – в 1,3 рази ($p < 0,05$).

Активність глутатіон-S трансферази в лімфоцитах в контролі складала ($112,2 \pm 9,2$) нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну. При дії ципрофлоксацину вона зростає в 2,3 ($p < 0,001$), левофлоксацину – в 3,1 ($p < 0,001$), а моксифлоксацину – в 3,8 рази ($p < 0,001$).

Таким чином, отримані нами результати щодо дії декаметоксину та фторхінолонів вказують на суттєві зміни аргіназо-NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної систем лімфоцитів крові, що призводить до їх дисбалансу і порушення регуляторної ролі.

Ключові слова: декаметоксин, фторхінолони, мікроорганізми, стафілокок, сальмонели, адгезія, антибіотики, антисептики, резистентність, лімфоцити, аргіназа, NO-синтаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза.

SUMMARY

Kovalenko I.V. «Antimicrobial action of decamethoxine and fluoroquinolones and their effect on the arginase/NO synthase and antioxidant system of blood lymphocytes» – a qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a Doctor of Philosophy Degree in specialty 091 Biology (03.00.04 – Biochemistry). – Institute of Animal Biology NAAS of Ukraine, Lviv, 2020.

The dissertation is devoted to the study of antimicrobial action of decamethoxine anesthetics and antibiotics of fluoroquinolone series and their effect on arginase/NO synthase and antioxidant system of human blood lymphocytes.

It is shown that decamethoxin (DCM) and its dosage form decasan (DS) showed the same microbicidal activity against *E. coli* museum strains ($15.62 \mu\text{g/ml}$), *C. albicans* ($16 \mu\text{g/ml}$), *E. faecalis* ($0,97 \mu\text{g/ml}$), *Bac. subtilis* ($0.24 \mu\text{g/ml}$). DS was

less microbocidally active against *S. aureus* (0,48 µg/ml) compare to DCM (0.24 µg/ml).

DS was also less microbicidal active against *P. aeruginosa* (250 µg/ml) than DCM (62.5 µg/ml).

Analysis of the study results of the clinical strains microorganisms sensitivity to DCM and DS showed a high bactericidal effect on strains *S. epidermidis* (from (1.16±0.14) to (1.45±0.15) µg/ml); *S. aureus* (from (1.19±0.59) to (1.52±0.67) µg/ml); *E. coli* (from (15.62±1.3) to (18.46±1.8) µg/ml); *P. aeruginosa* (from (36.5±7.91) to (39.48±6.85) µg/ml), fungicidal action against *C. albicans* (from (13.39±1.12) to (15.63±1.13) µg/ml). Thus, both drugs, DCM and DS have microbicidal effect against staphylococci, enterococci, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. However, the patented DCM model outweighs the microbicidal DS.

Based on the results of studies, it was established that DCM and DS in different bacteriostatic (MBsC) and bactericidal (MBcC) concentrations significantly affect the adhesive capacity of gram-positive (staphylococci) and gram-negative (*Escherichia*) bacteria. At the presence of MBsC antiseptics, the percentage of bacterial cells adhesion of staphylococci decreased both in the presence of DCM and in the presence of DS by 58-59 %. MBsC of antibacterial drugs inhibited the adhesion process of *Escherichia* much more intensively.

Regarding the resistance of microorganisms, it was found that strains of staphylococci slowly formed resistance to DCM. After five passages the resistance of two strains of staphylococcus increased twice and the 30 passages showed that resistance of *S. aureus* ATCC 25923 to DCM increased in 64 times and *S. aureus* 27 in 32 times. The resistance of *Candida albicans* to DCM was forming slowly. Thus, after 30 passages on nutrient media at the presence of DCM, resistance of *Candida albicans* increased in 16 times.

A study of the resistance formation to dosage forms showed that *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27 formed resistance to DC, which increased in 4-8 times (1,95 мкг/мл) after 10 passages of cultivation. After 30 passages it increased in 64

times respectively. Formation of *C. albicans* 14, *C. albicans* 51 strains resistance to DC has shown that their resistance increased after 10 passages in 8 times and test-strains of *C. albicans* were in 32 times more stable than the baseline after 30 passages.

Thus, it has been proved that for staphylococci, *C. albicans* the resistance to decamethoxine and decasan slowly in vitro forms, which increases in 16-64 times after 30 passages.

In modern conditions, it is advisable to study the sensitivity of *S. aureus* to fluoroquinolones, which are constantly used in the treatment of seriously ill patients with purulent-inflammatory diseases. According to the results of the researches, the prognostic analytical expressions of sensitivity dynamics to fluoroquinolones of *S. aureus* clinical strains, which caused purulent-inflammatory complications in patients with severe burns, were first obtained. In clinical strains of *Staphylococcus aureus*, the predicted sensitivity to ciprofloxacin tends to decrease and increases to levofloxacin. The sensitivity of *S. aureus* to moxifloxacin is high (92.5 %).

Since decamethoxine has hydrophilic and lipophilic properties, it can penetrate into cells, blood, through surfaces of wounds, mucous membranes, skin, etc., and can be transmitted by blood to different organs and tissues, and thus, to cause a variety of biochemical effects, in particular, regarding to the regulatory NO-synthase system of cells. In this respect, the biological action of decamethoxine has not yet been substantially investigated.

It has been shown that at concentrations of 10^{-5} – 10^{-2} M decamethoxine dose-dependently leads to an increase of arginase activity. At 10^{-2} M concentration in 1.4 times relative to control ($p < 0.05$) in lymphocytes under the action of fluoroquinolones. Effect on blood lymphocytes of fluoroquinolones also shows a concentration-dependent increase of arginase enzymatic activity, reaching the plateau. Simultaneously the activity increased in the range: control → ciprofloxacin → levofloxacin → moxifloxacin. These data directly correlate with generations of fluoroquinolones. The highest activity is observed with the action of moxifloxacin belonging to the fourth generation.

Calculation of the kinetic parameters of arginase activity showed that an increase of arginase activity in lymphocytes under the action of fluoroquinolones is due to the increase in the number of the enzyme revolutions (V_{max} increases), although the substrate affinity for the enzyme is reduced (K_{L-arg} increases).

Since, L-arginine is a substrate not only for arginase but also for all NO-synthase isoforms, the next step was to study the activity of individual NO-synthase isoforms and their kinetic features under the action of fluoroquinolones.

It was shown that the activity of the constitutive isoform of NO synthase in control was (71.4 ± 6.9) and the activity of the inducible isoform (1.58 ± 0.18) nmol NADPH(H^+)/min per 1 mg of protein. With the action of decamethoxine at a concentration of 10^{-5} M the activity of cNOS decreased in 1.25 times ($p < 0.05$) and the activity of iNOS increased in 10.8 times ($p < 0.001$).

Studies on the effect of fluoroquinolones on the activity of individual isoforms of NO synthase revealed that 10^{-5} M concentration of moxifloxacin causes a decrease of cNOS activity in 10,2 times ($p < 0.001$), levofloxacin in 5.5 times ($p < 0.001$) and levofloxacin in 4.2 times ($p < 0.001$) compare to the control group ($p < 0.001$).

When studying the effect of fluoroquinolones on the activity of iNOS in lymphocytes isolated from the blood of healthy women, we did not observe its activation and the inhibitory effect could not be determined due to its low activity.

Oxidative stress was used to induce iNOS activity in blood lymphocytes by preincubating lymphocytes with H_2O_2 . Lymphocyte preincubation with 0.2 mM H_2O_2 leads to iNOS activity increase in 31.3 times. During iNOS activation by hydrogen peroxide, ciprofloxacin leads to inhibition of enzyme activity in 1,2 times ($p < 0.05$), levofloxacin in 1.4 times ($p < 0.05$), and moxifloxacin in 2.3 times ($p < 0.001$)

When the action on the body of xenobiotics in particular drugs free-radical oxidative processes are often initiated in cells.

A comparative study of processes of LPO and the glutathione system in peripheral blood lymphocytes under the action of decamethoxin was conducted. It is shown a slight inhibition of LPO processes under the action of different

concentrations of decamethoxine. Thus, the concentration of MDA in blood lymphocytes is (62.3 ± 4.6) nmol/mg protein of the control group. Under the influence of the different concentrations of decamethoxine (10^{-5} – 10^{-2} M) this numeric value decreases but it is non significant ($p > 0.001$).

Simultaneously, with a slight decrease in process LPO appropriate changes in the activity of glutathione system enzymes were revealed. Thus, it was shown that lymphocyte glutathione peroxidase activity is (154.2 ± 13.4) nmol GSH/min·mg protein in control. Under the action of decamethoxine, this activity increases dose-dependently ($p < 0.05$).

Regarding glutathione reductase its activity was (51.7 ± 4.2) nmol NADPH/min·mg protein in a control. With the action of decamethoxine in concentrations of 10^{-5} – 10^{-2} M this activity increased in 1.2 times ($p < 0.05$) dose-dependently.

The activity of glutathione-S transferase in a control was (12.2 ± 9.2) nmol GSH/min·mg of protein. At an addition of decamethoxine in 10^{-5} – 10^{-2} M concentrations to the incubation medium this enzyme was activated dose-dependently, which activity increased in 1.4 times ($p < 0.05$).

Thus, it has been shown that antiseptic decamethoxine significantly influences the regulatory mechanisms of the cell, in particular blood lymphocytes, by activating enzymes of the glutathione antioxidant system.

A comparative study of the processes of LPO and glutathione system in peripheral blood lymphocytes under the influence of fluoroquinolones of II-IV generations. In all cases, the activation of the LPO processes is shown. Thus, in the blood lymphocytes of a control, the concentration of MDA is (4.1 ± 0.4) μ mol/l. With the action of ciprofloxacin (II generation), the processes of LPO intensify in 1.7 times regarding indicators in the control group ($p < 0.001$). Due to levofloxacin (III generation) lymphocytes, the processes of LPO are further activated, the concentration of MDA increases in 1.8 times relative to control values ($p < 0.001$). A similar situation is observed when determining the concentration of MDA in blood lymphocytes under the action of moxifloxacin (IV generation), which leads to an increase of MDA in 1.9 times ($p < 0.001$). A direct dependence can be seen of the

LPO processes activation on antibiotics generation in a number: moxifloxacin > levofloxacin > ciprofloxacin.

Along with the intensification of the processes of LPO, the corresponding changes in the activity of enzymes of the glutathione system have been revealed. Thus, glutathione peroxidase activity of lymphocytes under the action of ciprofloxacin increased in 1.1 times ($p>0.05$), under the action of levofloxacin in 1.2 times ($p>0.05$) and under the action of moxifloxacin in 1.3 times ($p<0.05$). That is a significant increase in the activity of glutathione peroxidase occurs only under the action of moxifloxacin.

Regarding glutathione reductase activity in lymphocytes, it was (51.7 ± 4.2) nmol NADPH/min mg of protein of a control. With ciprofloxacin, it decreased in 1.2 times ($p<0.05$), levofloxacin in 1.2 times ($p<0.05$), and with moxifloxacin in 1.3 times ($p<0.05$).

Glutathione-S transferase activity in lymphocytes of a control was (112.2 ± 9.2) nmol GSH/min·mg protein. With ciprofloxacin it increased in 2.3 times ($p<0.001$), levofloxacin in 3,1 times ($p<0.001$), and with moxifloxacin in 3,8 times ($p<0.001$).

Thus, the results obtained regarding the action of decamethoxin and fluoroquinolones indicate significant changes in the arginase-NO-synthase and glutathione antioxidant systems of blood lymphocytes, which leads to their imbalance and impaired regulatory role.

Keywords: decamethoxine, fluoroquinolones, microorganisms, staphylococcus, salmonella, adhesion, antibiotics, antiseptics, resistance, lymphocytes, arginase, NO-synthase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S transferase.

Список публікацій здобувача:

1. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Vorobets NM, Melnyk OV, Vorobets ZD. Arginase/NO-synthase system characteristics in blood lymphocytes under effect fluoroquinolones. Regulatory Mechanisms in Biosystems.

- 2019;10(2):203-08 (Web of Science). *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
2. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Melnyk OV, Korchynska OS, Vorobets NM, Vorobets ZD. Effect of fluoroquinolones on the activity of the glutathione system in the peripheral blood lymphocytes. Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry. 2019;3(87):23-9. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
 3. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Fafula RV, Vorobets ZD. Fluoroquinolones influence on the L-arginine/NO system activity in blood lymphocytes. Slovak International Scientific Journal. 2020;1(39):3-6. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
 4. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Fafula RV, Melnyk OV, Vorobets ZD. Characteristics of antioxidant and NO-synthase systems of blood lymphocytes under the action of decamethoxine. Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry. 2020;1(88):15-22. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
 5. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Fafula RV, Vorobets ZD. Characteristics of kinetic indicators of arginase and NO-synthase isoforms in peripheral blood lymphocytes under the action of fluorohinolones. Polish Journal of Science. 2020;28(2):7-13. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
 6. Коваленко ІВ, Воробець ЗД. Вплив антибіотиків фторхінолонового ряду на активність аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові. Збірник праць XIII Міжнаодної міждисциплінарної наук.-практ. конф. Сучасні аспекти збереження здоров'я людини; 2020 квіт. 3-4;Ужгород; 2020, с.

- 286-91. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
7. Палій ГК, Назарчук ОА, Нагайчук ВІ, Осадчук НІ, Палій ДВ, Коваленко ІВ. Аналітичне прогнозування чутливості стафілококу до фторхінолонів. Світ медицини та біології. 2015;3(51):103-6. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
8. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Яцула ОВ, Буркот ВМ. Дослідження дії декаметоксину та його лікарських форм на адгезію бактерій. Світ медицини та біології. 2015;4(54):109-12. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
9. Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Гончар ОО, Яцула ОВ. Мікробіологічна характеристика резистентності мікроорганізмів до антисептичних препаратів. Вісник проблем біології і медицини. 2015;2(125):282-6. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
10. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Буркот ВМ. Антимікробні властивості генериків декаметоксину. Медична та клінічна хімія. 2015;4(61):43-6. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
11. Палій ГК, Назарчук ОА, Бобир ВВ, Гончар ОО, Гридїна ТЯ, Палій ДВ, та ін. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків. Мікробіологія і біотехнологія. 2015;4(32):67-74. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
12. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Яцула ОВ. Вивчення антимікробних властивостей лікарських антисептичних препаратів, що містять декаметоксин. Український біофармацевтичний

- журнал. 2016;1(42):74-8. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
13. Палій ДВ, Яцула ОВ, Дудар АО, Коваленко ІВ. Вивчення дії антимікробних препаратів на адгезивні властивості бактерій. Вісник проблем біології і медицини. 2016;2(128):174-7. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
14. Палій ГК, Назарчук ОА, Гончар ОО, Коваленко ІВ, Яцула ОВ. Дослідження фізико-хімічних, протимікробних властивостей лікарського препарату «декаметоксин». Медична та клінічна хімія. 2016;18(1):36-40. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
15. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Корнійчук ОП, Воробець ЗД. Вплив фторхінолонів на регуляторну систему аргіназа/NO-синтаза лімфоцитів крові. Підсумкова LXII наук.-практ. конф. присвячена 165-річчю від дня народження І.Я. Горбачевського. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2019 черв.13; Тернопіль; 2019, с. 86-7.
16. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Корчинська ОС, Корнійчук ОП. Реакція аргіназно-NO-синтазної системи лімфоцитів крові на дію антибіотиків фторхінолонового ряду. 6-th Ukrainian congress for cell biology with international representation. 2019 Jun 18-21; Yaremche, Ukraine; 2019, p. 57.
17. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Мельник ОВ, Корчинська ОС, Корнійчук ОП. Кінетичний аналіз активності ензимів NO-синтазної системи лімфоцитів крові за дії антибіотиків фторхінолонового ряду. Medical and Clinical Chemistry. 2019;3(80):96-7.
18. Палій ДВ, Коваленко ІВ, Салдан ЮЙ, Гончар ОО. Властивості збудників інфекційних захворювань і їх чутливість до антибіотиків, антисептиків. Матеріали всеукраїнської наук.-практ. конф. за участю міжнародних

- спеціалістів. Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями; 2015 трав. 14-15; Харків; 2015, с. 46.
19. Гончар ОО, Коваленко ІВ. Оцінка формування резистентності у мікроорганізмів до антибіотиків і антисептиків. Матеріали VI міжнародної наук.-практ. конф. молодих вчених; 2015 трав. 15; Вінниця; 2015, с. 38.
20. Назарчук ОА, Коваленко ІВ. Аналіз ефективності сучасних антибіотиків, антисептиків щодо збудників госпітальної інфекції. Матеріали щорічної 12-ої наук.-практ. конф. з міжнародною участю приуроченої до дня науки, 75-річчя інституту, 105-річчя Г.С. Мосінга; 2015 трав. 21-22; Львів; 2015, с. 113-4.
21. Paliy D, Nazarchuk O, Gonchar O, Saldan Yu, Kovalenko IV. Microbiology study of modern antiseptic remedies. Abstracts of the International conference for young scientists. Actual problems of microbiology and biotechnology; 2015 Jun 1-4; Odesa; 2015, с. 43.
22. Nazarchuk OA, Nahaichuk VI, Saldan YuJ, Kovalenko IV, Burkot VM. The research of the qualities in non-enzymatic bacteria, isolated from patients with infectious complications. Abstracts book of the II International scientific conference. Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century; 2016 Apr 14-15; Kyiv; 2016, с. 79-80.
23. Зарицький ОО, Коваленко ІВ. Дослідження антисептичних препаратів у пацієнтів з інфекційними ускладненнями після травми. Матеріали Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених. Перший крок в науку – 201; 2017 квіт. 26-28; Вінниця; 2017. с. 35.
24. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Воробець ЗД. Вплив декаметоксину на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної та антиоксидантної систем лімфоцитів крові. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю. Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного

походження, присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету; 2020 трав. 19-20; Івано-Франківськ; 2020. с. 126-7.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА МЕХАНІЗМ ДІЇ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ФТОРХІНОЛОНІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	28
1.1. Особливості антимікробної дії декаметоксину та його вплив на регуляторні системи клітини	28
1.2. Особливості антимікробної дії фторхінолонів та їх вплив на регуляторні системи клітини	35
1.3. Мофо-функціональна характеристика лімфоцитів крові	40
1.4. Функціональна характеристика та роль аргінази лімфоцитів крові.....	43
1.5. Функціональна характеристика та роль Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові.....	46
1.6. Пероксидація ліпідів і система антиоксидантного захису клітин.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
2.1. Об'єкт досліджень	52
2.2. Дослідження антимікробних властивостей декаметоксину	53
2.3. Визначення адгезивних властивостей бактерій за дії декаметоксину....	53
2.4. Дослідження резистентності бактерій до декаметоксину	54
2.5. Аналітичне прогнозування чутливості бактерій до фторхінолонів	55
2.6. Виділення лімфоцитів периферичної крові	56
2.7. Визначення активності аргінази	57
2.8. Визначення активності конститутивної та індуцибельної ізоформ NO-синтази	58
2.9. Визначення глутатіонпероксидазної активності	59
2.10. Визначення глутатіонредуктазної активності	60
2.11. Визначення глутатіонтрансферазної активності	60
2.12. Визначення вмісту відновленого глутатіону	61
2.13. Оцінка стану пероксидації ліпідів за визначенням концентрації	

малонового діальдегіду	61
2.14. Визначення концентрації протеїну	62
2.15. Статистична обробка даних	62
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ	
ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ФТОРХІНОЛОНІВ	64
3.1. Антимікробна дія декаметоксину	64
3.2. Вплив декаметоксину на адгезію бактерій	66
3.3. Характеристика резистентності мікроорганізмів до декаметоксину	69
3.4. Антимікробна властивість фторхінолонів	74
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА	
ФТОРХІНОЛОНІВ НА АРГІНАЗА/NO-СИНТАЗНУ СИСТЕМУ	
ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ	79
4.1. Аргіназна активність лімфоцитів крові за дії декаметоксину та	
фторхінолонів	79
4.2. Активність конститутивної та індукцйбельної ізоформ NO-синтази	
лімфоцитів крові за дії декаметоксину та фторхінолонів	88
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА	
ФТОРХІНОЛОНІВ НА ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМИ	
ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ	103
5.1. Пероксидація ліпідів і система глутатіону в лімфоцитах крові за дії	
декаметоксину	103
5.2. Пероксидація ліпідів і система глутатіону в лімфоцитах крові за дії	
фторхінолонів.....	107
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	
ВИСНОВКИ	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	142

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

GSH – глутатіон відновлений

GSS – глутатіон окиснений

GR – глутатіонредуктаза

GP – глутатіонпероксидаза

GsT – глутатіонтрансфераза

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

NADPH – нікотинаміддинуклеотидфосфат відновлений

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

eNOS (NOS-III) – ендотеліальна (коститутивна) ізоформа синтази оксиду азоту

iNOS (NOS-II) – індукцибельна ізоформа синтази оксиду азоту

NO – нітроген (II) оксид

NOS – синтаза оксиду азоту

ONOO⁻ – пероксинітрит

OC – оксидативний стрес

ДКМ – декаметоксин

ДС – декасан

МБсК (МФсК) – мінімальна бактеріостатична (фунгінстатична) концентрація

МБцК (МФцК) – мінімальна бактерицидна (фунгіцидна) концентрація

ІА – індекс адгезивності

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

ВСТУП

Актуальність теми. Пошук і впровадження в клінічну практику нових антимікробних препаратів, до яких буде залишатися висока чутливість збудників інфекційно-запальних захворювань, та вивчення їх механізму дії на макроорганізм є актуальним завданням сучасної медицини, фармації, біохімії. Важливе місце в етіотропній терапії гнійно-запальних ускладнень займають антисептики та антибіотики, що активні стосовно патогенної мікрофлори. Завдяки широкому спектру антимікробної дії, низькій токсичності, добрими фармакокінетичними властивостям, такий антисептик як декаметоксин та антибіотики - фторхінолони широко використовуються при лікуванні бактеріальних інфекцій різної локалізації [66-78, 93, 95, 127 141]. Це препарати, ультраширокого спектру дії, активні стосовно грампозитивних і грамнегативних, аеробних та анаеробних мікроорганізмів, хламідій, мікоплазм, мікобактерій [12, 13, 61-64, 122, 130, 141, 153].

Одним із найпоширеніших антисептиків є лікарський препарат «Декаметоксин». На основі нього виготовлені і інші препарати – горостен, декасан, аурідексан, септефріл тощо [63, 72, 175, 177].

Ці препарати мають виражений бактерицидний вплив на стафілококи, стрептококи, дифтерійну та синьогнійну палички. Утворення стійких до декаметоксину форм відбувається дуже повільно.

З іншого боку, для лікування важких хворих із гнійно-запальними захворюваннями, зокрема спричинених золотистим стафілококом, широко використовують фторхінолони - ципрофлоксацин, левофлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин [67, 94, 152, 156]. Ці препарати пригнічують активність ДНК-гірази (ДНК-топоізомерази II) грам-негативних бактерій і ДНК-топоізомерази IV грам-позитивних бактерій і, таким чином, порушують біосинтез ДНК та РНК [127, 153]. Зокрема, при дії фторхінолонів відбувається деспіралізація ДНК бактеріальної клітини, порушення її просторової структури і, як наслідок, порушення процесу реплікації, транскрипції, трансляції та загибель клітини.

Протимікробні лікарські засоби – анестетики - діють на структурні елементи клітинної стінки мікроорганізмів, локалізують збудника в рані, гальмують його проникнення в кров і лімфу, гальмують адгезію мікроорганізмів до раневої поверхні, пригнічують патогенність [10-13]. Вважають, що вони також володіють імуностимулюючими властивостями. Таким чином, антисептики та антибіотики суттєво впливають на перебіг інфекційного процесу.

Оскільки декаметоксин і фторхінолони володіють гідрофільними та ліпофільними властивостями, вони прямо через кров, чи через ранові поверхні, слизові оболонки, шкіру тощо можуть проникати в клітини, кров, розноситись кров'ю до різних органів і тканин і, таким чином, спричиняти різноманітні біохімічні ефекти. Також фторхінолони можуть індукувати оксидативний стрес і впливати на активність ензимів антиоксидантного захисту [186, 190, 192, 194]. У цьому плані біологічна дія декаметоксину та фторхінолонів дуже мало досліджена.

Для виявлення патологічних процесів, фізіологічних і біохімічних змін макроорганізму, зокрема спричинених дією фармпрепаратів, йде пошук нових біохімічних та інших маркерів, застосовуються біохімічні та інші методи досліджень. В цьому аспекті, роль Нітроген (II) оксиду (NO, оксид азоту), як універсального клітинного та тканинного метаболіту в регуляції клітинних функцій і паракринного регулятора міжклітинних і міжсистемних взаємодій, не викликає сумніву [17, 28, 32, 33, 96, 100,101,105].

Синтез NO здійснюється за участю NO-синтази (EC 1.14.13.39) з *L*-аргініну шляхом окисного метаболізму [80, 128, 132, 144]. *L*-аргінін також метаболізується за участю аргінази. Баланс між регуляторними фізіологічними та цитотоксичними властивостями значною мірою обумовлений локальною концентрацією NO, а також метаболічним статусом тканин, у яких синтезується та реалізує свій ефект NO [99, 115, 159, 161, 163]. NO бере участь в модифікації метаболізму ксенобіотиків, порушує

вільнорадикальний гомеостаз клітин і, таким чином, існує тісний взаємозв'язок між NO-синтазою та про/антиоксидантною системами [32, 132, 133, 138].

Вважається, що лімфоцити периферичної крові є «метаболічним дзеркалом» організму, а, відтак, можуть слугувати моделлю для вивчення впливу антисептиків і фторхінолонів на метаболічні та регуляторні системи клітини макроорганізму [42, 44, 81, 85, 214].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової наукової теми 35.00.02 лабораторії обміну речовин ім. С.З. Жицького Інституту біології тварин НААН «Створити методологію оцінки негативного впливу фосфорорганічних сполук на організм тварин і людини. Розробити метод захисту організму від можливих негативних впливів фосфорорганічних сполук» (державний реєстраційний номер 0116U001411) та фрагментом планової науково-дослідної теми кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Дослідження функціонально-метаболічних резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції» (державний реєстраційний номер 011101U000121).

Мета дослідження: з'ясувати особливості дії декаметоксину та фторхінолонів на грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми та їх вплив на аргіназа/NO-синтазу та глутатіонову антиоксидантну системи лімфоцитів крові.

Для досягнення поставленої мети у роботі було заплановано вирішення наступних завдань:

1. Дослідити антимікробну дію та вплив на адгезивні властивості мікроорганізмів декаметоксину та фторхінолонів.
2. Вивчити резистентність мікроорганізмів до дії декаметоксину та фторхінолонів.
3. Дослідити вплив декаметоксину та фторхінолонів на аргіназа/NO-синтазу систему лімфоцитів крові.
4. З'ясувати особливості дії декаметоксину на пероксидацію ліпідів і глутатіонову антиоксидантну систему лімфоцитів крові.

5. З'ясувати особливості дії фторхінолонів II – IV поколінь на пероксидацію ліпідів і глутатионову антиоксидантну систему лімфоцитів крові.

Об'єкт дослідження: антибактеріальні властивості декаметоксину та фторхінолонів, регуляторні системи антиоксидантного захисту та системи аргіназа/NO-синтаза у лімфоцитах периферичної крові.

Предмет дослідження: декаметоксин, фторхінолони, антибактеріальна активність, адгезія, резистентність, лімфоцити, аргіназа, NO-синтаза, пероксидація ліпідів, система глутатіону.

Методи дослідження: мікробіологічні (оцінка антимікробної дії препаратів, адгезивних властивостей і резистентності мікроорганізмів), біохімічні (препаративна біохімія, ензимологія, спектрофотометрія, біохімічна кінетика), лабораторної діагностики та статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше проведено комплексне дослідження антимікробної дії декаметоксину та фторхінолонів та їх впливу на аргіназа/NO-синтазу і про-/антиоксидантну системи лімфоцитів крові. Показано, що декаметоксин і його лікарська форма декасан проявляють високу мікробоцидну дію на музейні та клінічні штами стафілококів, ентерококів, кишкову паличку та *Candida albicans*.

За мінімальних бактеріостатичних концентрацій обох антисептиків, відсоток адгезованих бактеріальних клітин стафілококів та ешерихій зменшився. У стафілококів і *C. albicans* повільно формується стійкість *in vitro* до декаметоксину та декасану. У клінічних штамів золотистого стафілокока, прогнозована чутливість до ципрофлоксацину, має тенденцію до зниження та зростає до левофлоксацину. Високою є чутливість *S. aureus* до моксифлоксацину.

Вперше показано, що декаметоксин та фторхінолони дозозалежно призводять до зростання аргіназної активності в лімфоцитах крові. При цьому, за дії фторхінолонів, активність зростає в ряді: контроль → ципрофлоксацин → левофлоксацин → моксифлоксацин, що прямо корелює з поколіннями фторхінолонів.

За дії на лімфоцити крові декаметоксину, активність cNOS знижується, а активність iNOS зростає. Встановлено, що моксифлоксацин зумовлює найбільше зниження активності cNOS у лімфоцитах в порівнянні з іншими фторхінолонами. Фторхінолони не впливали на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових жінок. Після індукування активності iNOS пероксидом водню всі фторхінолони призводили до інгібування активності ензиму. Декаметоксин практично не впливав на пероксидацію ліпідів у лімфоцитах, а всі фторхінолони, в різній мірі, активують цей процес. Однак, як декаметоксин, так і всі фторхінолони, призводять до зростання глутатіонпероксидазної та глутатіонтрансферазної активностей.

Таким чином, отримано нові дані щодо ефективності впливу декаметоксину та різних поколінь фторхінолонів *in vitro* на різні види патогенних бактерій і грибів і впливу на регуляторні системи лімфоцитів крові – аргіназа/NO-синтазну та глутатіонову антиоксидантну системи.

Практичне значення отриманих результатів. Доведено виразну антибактеріальну та антифунгальну активність субстанції декаметоксину та готової лікарської форми декасану. Отримані дані щодо впливу декаметоксину та фторхінолонів на лімфоцити крові, обґрунтують розробку нових додаткових методів діагностики функціонального стану макроорганізму за активностями ензимів глутатінової антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем.

Результати впроваджено в навчально-педагогічний процес кафедр біохімії та медичної біології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри фармації Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, кафедри біомедицини Київського національного університету імені Тараса Шевченка, в накову роботу ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України».

Особистий внесок здобувача. Дисертант особисто провела патентно-інформаційний пошук, проаналізувала джерела літератури, разом із науковим керівником, визначила мету й завдання, обрала методи дослідження. Приймала участь у виконанні усіх експериментів, статистичній обробці

результатів, їх систематизації, підготувала публікації до друку. Мікробіологічні дослідження виконано за консультативної допомоги співробітників кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. Пирогова.

У працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належать фактичний матеріал і основний творчий доробок: результати власних досліджень, участь у аналізі та узагальненні отриманих даних, підготовці праць до друку.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційну роботу апробовано на фаховому семінарі лабораторій Інституту біології тварин НААН та кафедр біохімії та медичної біології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Результати досліджень та основні положення дисертації були представлені на наукових семінарах кафедри медичної біології (Львів, 2018-2020); Всеукраїнській науково-практичній конференції “Довкілля і здоров’я” (Тернопіль, 2015); Всеукраїнської науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів “Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями” Харків, 2015); VI міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (Вінниця, 2015); Щорічній 12-ій науково-практичній конференції з міжнародною участю приуроченої до Дня науки, 75-річчя інституту, 105-річчя Г.С. Мосінга (Львів, 2015); International conference for young scientists “Actual problems of microbiology and biotechnology” (Odesa, 2015); Науково-практичній конференції “Запалення: морфологічні, патофізіологічні, терапевтичні та хірургічні аспекти” (Вінниця, 2015); Всеукраїнській науково-практичній конференції “Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення” (Вінниця, 2016); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених “Перший крок у науку – 2016” (Вінниця, 2016); II International scientific conference “Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century” (Kyiv, 2016); International scientific conference «Molecular Microbiology and Biotechnology» (Odessa, 2016); Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (Вінниця, 2017); 6-th Ukrainian congress for cell biology

with international representation (Yaremche, 2019); LXII Науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2019); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019); XIII Міжнаодній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (Ужгород, 2020); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження», присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету (Івано-Франківськ, 2020).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 24 роботи, з яких 14 статей у наукових фахових виданнях (10 – у виданнях рекомендованих МОН України, із них 1 стаття у виданні, що входить в перелік наукометричних баз «Web of Science») та 10 тез доповідей у матеріалах наукових міжнародних і вітчизняних конференцій і конгресів.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 162 сторінках (основний обсяг становить 141 сторінку друкованого тексту і включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, власні дослідження, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних джерел, який містить 221 найменування (92 кирилицею і 129 латиницею). Дисертація ілюстрована 12 таблицями та 29 рисунками.

РОЗДІЛ 1.

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА МЕХАНІЗМ ДІЇ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ФТОРХІНОЛОНІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Особливості антитимікробної дії декаметоксину та його вплив на регуляторні системи клітини

Інфекційні захворювання розглядають як результат взаємодії збудників із клітинами організму хазяїна. Відомо, що однією з ранніх стадій інфекційного процесу є адгезія збудника в тканинах. Адгезія та колонізація служать пусковими механізмами інфекційного процесу. Мікроорганізми, активно долаючи природні захисні бар'єри макроорганізму, прикріплюються до поверхні клітин шкіри, слизових оболонок за допомогою адгезинів, що взаємодіють з клітинами макроорганізму. Специфічна адгезія відбувається внаслідок молекулярної взаємодії між адгезинами мікробної клітини та рецепторами клітин господаря. Адгезини належать до поверхневих структур мікробних клітин, до складу яких входять макромолекули лектинів, протеїнів і вони здатні зв'язувати карбогідрати. Рецептори адгезинів знаходяться на поверхні клітин у вигляді білкових фрагментів [13, 77,]. У грамнегативних мікроорганізмів адгезини входять до складу ворсинок, фімбрій, пілей. Їх називають фімбріальними адгезинами. Грампозитивні бактерії здійснюють адгезію за допомогою афімбріальних адгезинів. Структура афімбріальних адгезинів представлена білковими молекулами, що тісно зв'язані з цитоплазматичною мембраною бактеріальної клітини. Рецепторами для адгезинів грампозитивних бактерій є фібрoneктин, білки міжклітинного матриксу. Мікроорганізми, прилипаючи, колонізують епітелій дихальних шляхів, кишкового тракту, сечовидільної системи. В процесі інфекційного ураження адгезини мікроорганізмів запускають патологічний процес внаслідок розмноження збудників у тканинах [58]. Оскільки провідна роль в здійсненні взаємодії мікроорганізмів із мішенями належить процесам

міжмембранної взаємодії, науковці зосереджують увагу на вивченні адгезії для вдосконалення нових методів діагностики, лікування, профілактики інфекційних захворювань.

Відомо, що протимікробні лікарські засоби діють на структурні елементи клітинної стінки мікроорганізмів. Доведено, що лікарські антисептичні препарати локалізують збудники в рані; гальмують їх проникнення в кров і лімфу; блокують адгезію мікроорганізмів до клітин ранового ложа; пригнічують патогенність, гальмують проникнення, розмноження бактерій у тканинах пацієнтів. Антисептики можуть блокувати адгезію мікроорганізмів і суттєво впливати на перебіг інфекційного процесу в організмі людини. Пошук антимікробних засобів, що суттєво впливають на адгезію збудників захворювань та їх патогенна дія на макроорганізм, залишаються актуальним завданням [61, 69, 74].

Сучасна антимікробна терапія неможлива без антисептичних засобів. Антисептики – це лікарські препарати, що спричиняють антимікробну дію на мікроорганізми, локалізовані на поверхні шкіри та слизових оболонках. Вони володіють низькою гідрофільністю, але добре розчиняються в ліпідах, що призводить до їх накопичення у ліпідах шкіри та слизових оболонках і забезпечує антимікробний ефект [38, 39, 43, 47, 91].

Ефективність антисептиків визначається такими властивостями, як здатністю локалізувати збудника в рані, запобігати його розповсюдженню і проникненню до лімфатичного та кровоносного русла, знижувати адгезивні властивості мікроорганізмів, пригнічувати фактори патогенності бактерій, забезпечувати тривалий протимікробний ефект, підсилювати дію антибіотиків і різних фізичних факторів [38, 39, 43].

Антимікробна активність антисептичних препаратів обумовлена деструкцією мікробних структур (клітинної стінки, мезосом, нуклеоїду тощо), окиснення органічних речовин мікробної клітини, що призводить до загибелі останньої [38, 39]. Особливу увагу слід приділити мембраноатакуючій дії антисептиків на цитоплазматичну мембрану, що призводить до порушення

активного транспорту метаболітів, синтезу білка, поділу клітин. Завдяки ліпофільним властивостям, антисептичні препарати можуть проникати в ліпідний бішар плазматичної мембрани, порушувати при цьому її ліпідну структуру та функціонування. У бактеріальній клітині антисептики спричиняють антиметаболітну та антиензимну дію [63, 64, 91].

Слід підкреслити, що на позитивну оцінку заслуговують антисептики, здатні локалізувати збудників у патологічному осередку, попереджувати проникнення і поширення мікроорганізмів по лімфатичних і кровоносних судинах, порушувати адгезивну здатність бактерій до клітин тканин пацієнта [30, 71].

Перспективною, щодо антимікробних властивостей, виявилась група катіонних детергентів, зокрема четвертинних амонієвих сполук [47, 66, 70, 72, 179]. У ряді четвертинних амонієвих сполук унікальними політропними властивостями характеризується, вперше синтезований в Україні, антимікробний засіб декаметоксин ([1,10-декаметилен-(N,N-диметилментоксикарбонілметил) амонію дихлорид]) (рис. 1.1).

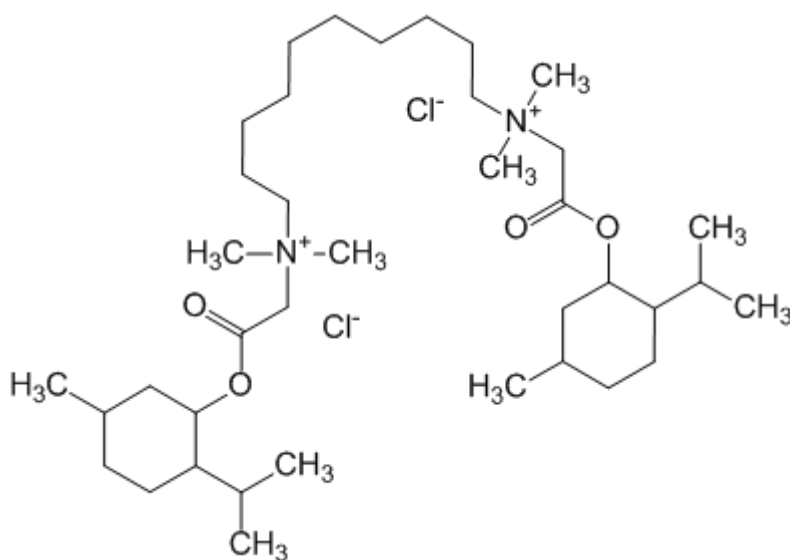


Рис. 1.1 Структурна формула декаметоксину

Це - високоактивний напівсинтетичний препарат, що складається із синтетичної декаметиленової частини молекули та ментолового ефіру олії м'яти перцевої [70, 126]. За протимікробною активністю, широким спектром

бактерицидної, фунгіцидної, противірусної дії, не поступається іншим сучасним закордонним антисептикам. Поряд із протимікробними, декаметоксин володіє десенсибілізуючими та імуномодуючими властивостями. Для декаметоксину доведена спроможність знижувати резистентність до антибіотиків у патогенних бактерій, що значно покращує ефективність лікування [64, 73, 78]. Декаметоксин здатен змінювати поверхневий натяг на межі поділу фаз [11, 16, 47, 68, 72,].

Декаметоксин є катіонною поверхнево активною речовиною. Застосовується у вигляді водних, спиртових, водно-спиртових, гліцеринових розчинів [18, 70]. Легкість призначення, фармакокінетичні властивості, висока ефективність створили великий потенціал декаметоксину з метою як терапевтичного, так і профілактичного застосування. Цьому препарату притаманний широкий спектр антимікробної дії: протибактеріальна, противірусна та протигрибкова активності. Декаметоксин виявляє виразний бактерицидний вплив на стафілококи, стрептококи, дифтерійну та синьогнійну палички, капсульні бактерії, а також фунгіцидну дію на дріжджоподібні гриби роду *Candida*, збудники епідермофітії, трихофітії, мікроспорії, еритразми, деякі види пліснявих грибів, сальмонели [11, 23, 47, 55, 69, 71, 72, 79, 174-177].

Доведено, що декаметоксин виявляє активність щодо мікроорганізмів, резистентних до левоміцетину, тетрациклінів, стрептоміцину, мономіцину, канаміцину, неоміцинів, новобіоцину, еритроміцину, олеандоміцину [68, 72, 74]. Формування стійких до препарату форм відбувається дуже повільно. Бактеріостатичні (фунгістатичні) концентрації близькі до його бактерицидних (фунгіцидних) концентрацій [70]. Встановлено, що в процесі лікування декаметоксином, підвищується чутливість антибіотикорезистентних мікроорганізмів до антибіотиків [63].

Визначено, що декаметоксин відрізняється від інших катіонних антисептиків, позитивними політропними властивостями, високою протимікробною активністю щодо широкого спектру умовно-патогенних і

патогенних мікроорганізмів, що значно розширює можливості його медичного використання [38, 39].

Встановлено, що декаметоксин (25 мкг/мл) не чинить токсичної дії на інфузорії *Colpoda steinii*, культуру клітин курячих ембріонів [73]. Патоморфологічні дослідження показали, що препарати декаметоксину практично не впливають на морфологію внутрішніх органів лабораторних тварин [24]. Механізм протівірусної дії декаметоксину, як поверхнево активної речовини, полягає у перешкодженні взаємодії вірусних поверхневих протеїнів [14]. Декаметоксин впливає на ранні етапи взаємодії вірусу з чутливою клітиною, такі як адсорбція, проникнення та депротейнізація вірусу грипу.

На фармацевтичному ринку України зареєстровано 13 препаратів декаметоксину, що застосовуються як місцеві антисептики [19].

Так, наприклад, декаметоксин у формі 0,02 % ізотонічного розчину має назву «Декасан» [18, 29, 126]. Застосовується для лікування гнійничкових бактеріальних і грибкових захворювань шкіри, мікробної екземи, гнійно-запальних уражень м'яких тканин (абсцеси, карбункули, флегмони, фурункули, гнійні рани, панариції); стоматологічних захворювань (стоматити, виразково-некротичний гінгівіт, дистрофічно-запальна форма пародонтозу I-II ступеня в стадії загострення); легневих і ЛОР-захворювань (хронічний бронхіт, абсцес легенів, тонзиліт, ангіна); гінекологічних хвороб – для лікування кандидозу слизової оболонки піхви, запальних захворювань геніталій мікробного походження, передпологової санації пологових шляхів, лікування післяпологового ендометриту; гігієнічної дезінфекції шкіри рук медперсоналу та гумових рукавичок під час обстеження хворих і виконання медичних маніпуляцій і малих хірургічних втручань, передстерилізаційної дезінфекції медичних інструментів і діагностичного обладнання з металів, гуми, полімерних матеріалів та скла.

Широкий спектр антимікробної дії препарату декасан полягає в його бактерицидній, вірусцидній, фунгіцидній та антипротозойній дії. Доведена

висока протимікробна активність препарату щодо стрептококів, дифтерійних паличок, кампілобактерій, клостридій, збудника сибірки, неспороутворюючих анаеробів, хламідій, мікоплазм, трихомонад, лямблій [11, 39, 47, 66, 69, 71, 72, 79].

Декасан поряд із протимікробним ефектом позитивно впливає на природну і специфічну імунну реактивність, викликає статистично достовірне наростання титру комплементу. Десенсибілізуюча дія препарату виявляється в уповільненні розвитку анафілактичного шоку в експериментальних тварин [39]. Доведена наявність протизапальної дії декасану, механізм якої пов'язаний з пригніченням продукції серотоніну клітинами і антиексудативним ефектом [26, 39, 74]. Корисною властивістю декасану слід вважати його здатність підвищувати чутливість мікроорганізмів до антибіотиків. У присутності суббактеріостатичних доз декасану, підсилюється дія канаміцину, гентаміцину, стрептоміцину, еритроміцину, пеніциліну, тетрацикліну тощо [39].

Лікарський препарат декасан доцільно застосовувати для місцевого лікування хворих на хронічний генералізований катаральний гінгівіт та хронічний генералізований пародонтит, у тому числі виразково-некротичний гінгівіт, дистрофічно-запальну форму пародонтиту I-II ступеня тяжкості в стадії загострення, що встановлено за виразною ефективністю засобу за клінічних умов [38, 72].

Встановлено, що декасан одночасно з протимікробною, виявляє спазмолітичну дію на непосмуговані м'язи бронхіального дерева. Декасан є ефективним лікарським засобом лікування запальних захворювань органів дихання з бронхо-обструктивним синдромом [39, 79].

Декасан чинить виразний клінічний ефект у хворих на абдомінальну інфекцію. Встановлено, що промивання черевної порожнини післяопераційних пацієнтів препаратом декасан, на відміну від хлоргексидину, поряд із системним використанням антибіотиків у

комплексній терапії абдомінальної інфекції різного генезу, дає змогу зменшити дози антибактеріальних засобів і тривалість лікування [86, 87].

За клінічних умов доведено, що програмовані санації черевної порожнини декасаном із урахуванням адекватно проведеного хірургічного втручання є ефективним методом інтенсивної терапії розлитого післяопераційного перитоніту [90].

За аналізом результатів, отриманих на музейних і клінічних штаммах збудників гнійно-запальних захворювань, встановлено, що антисептичний розчин декасан, за антимікробними властивостями, має значні переваги порівняно з фурациліном [76].

Препарат декасан чинить виразну протимікробну дію на віруси, антибіотикорезистентні штами грампозитивних бактерій, *C. albicans*. За впливом на антибіотикорезистентні штами бактерій, декасан виявляє кращу антимікробну активність, порівняно з хлоргексидином та етонієм [73].

Отримано клінічні дані щодо ефективності використання препарату декасан як внутрішньопорожнинного антисептика у комплексному лікуванні гострих абсцесів легень [54]. Клінічно доведено доцільність місцевого використання препарату декасан у комплексній терапії хворих на посттравматичний остеомієліт [74].

Аналіз літературних джерел показав, що кишкові інфекції є актуальною медико-санітарною проблемою, а сучасні засоби їх корекції не завжди є ефективними та безпечними. Перспективним є дослідження та розробка нових препаратів для лікування шлунково-кишкових інфекцій, або удосконалення підходів до застосування існуючих протимікробних засобів, зокрема, антисептика декаметоксину.

Враховуючи виразну антибактеріальну, протигрибкову та противірусну дію декаметоксину, а також відсутність експериментальних і клінічних даних щодо ефективності препаратів декаметоксину *in vivo* при кишкових інфекціях, доцільно дослідити терапевтичний потенціал перорального застосування розчину декасан.

Широкий спектр антимікробної активності, відсутність резорбтивної дії і, як наслідок, сприятливий профіль нешкідливості, [72] спонукають до подальших досліджень декаметоксину з метою розширення кола показань для його застосування.

Враховуючи те, що декаметоксин проявляє імуномодулювальні, десенсибілізувальні, спазмолітичні властивості [72], а також призводить до зміни лейкоцитарної формули, зокрема концентрації нейтрофілів, еозинофілів, лімфоцитів, моноцитів [66], можна припустити, що він через ранові поверхні, слизові оболонки, епітелій може проникати в кров, розноситись до різних органів і тканин і впливати на їх функціонування. Однак літературні дані щодо впливу декаметоксину на такі регуляторні системи клітини як аргіназо-NO-синтазна та про-/антиоксидантна системи практично відсутні.

1.2 Особливості антимікробної дії фторхінолонів та їх вплив на регуляторні системи клітини

Посилення антимікробної дії хінолонів пов'язано з синтезом ди- і трифторованих сполук, що володіють кращою активністю щодо грампозитивних бактерій (особливо *Streptococcus pneumoniae*) та інших внутрішньоклітинних збудників. Фторхінолони являють собою похідні 4-хінолону, що містять у положенні 7 хінолінового ядра незаміщений або заміщений піперазиновий цикл, а у положенні 6 – атом фтору (рис. 1.2).

За кількістю атомів фтору в молекулі, фторхінолони розподіляються на монофторхінолони, дифторхінолони та трифторхінолони [82, 88]. Створення лікарських засобів із двома та трьома атомами фтору в молекулі, вплинуло не тільки на антимікробну активність, але й на їх фармакокінетику. Найбільш вивчені та широко застосовуються в клініці монофторовані сполуки.

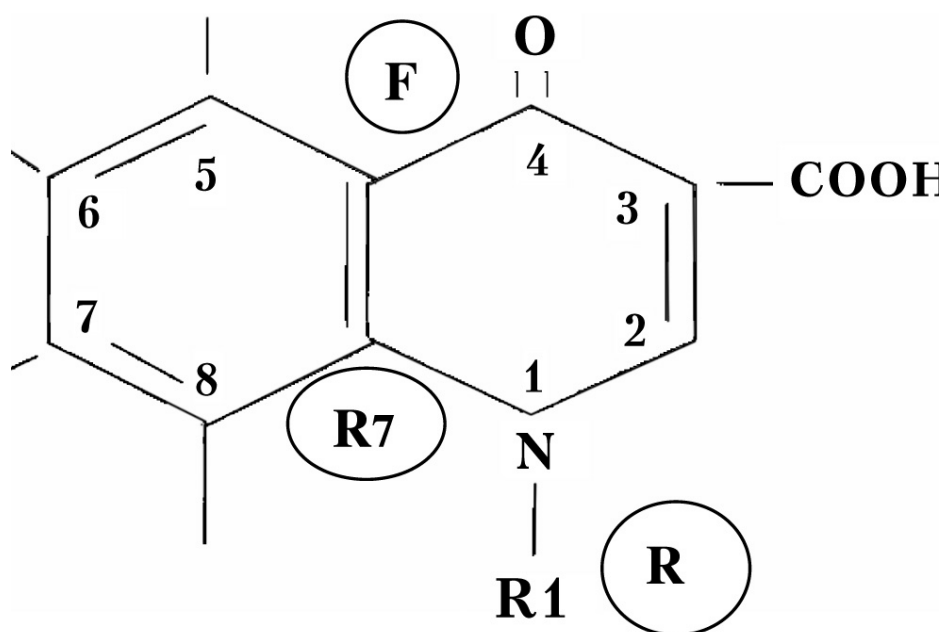


Рис.1.2. Хімічна структура фторхінолонів

Згідно сучасної класифікації є три покоління фторованих хінолонів. До II покоління відносять ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин. Ці антибіотики володіють високою активністю щодо грампозитивних мікроорганізмів і їх вважають «золотим стандартом» при лікуванні уrogenітальних інфекцій.

Так звані «респіраторні» фторхінолони, відносяться відповідно до сучасної класифікації до III (спарфлоксацин, левофлоксацин) і IV (моксифлоксацин, гатифлоксацин) поколінь хінолонів [25, 40, 114]. „Респіраторні” фторхінолони III покоління (левофлоксацин, спарфлоксацин), протианаеробні та „респіраторні” фторхінолони IV покоління (гатифлоксацин, моксифлоксацин) володіють підвищеною бактеріорезистентністю і здебільшого використовуються у лікуванні респіраторних інфекцій та інфекцій сечостатевої системи [40, 82, 88].

Механізм дії фторхінолонів на мікробну клітину відрізняється від дії інших антимікробних лікарських засобів, зокрема антисептиків. Він полягає у пригніченні ДНК-гірази (топоізомерази) бактерій – ензима, що забезпечує суперспіралізацію ДНК [129, 130, 172]. Це призводить до порушення біосинтезу ДНК, РНК і білка в мікробній клітині та її загибелі. Під дією фторхінолонів знижуються агресивні властивості бактерій, підвищується

чутливість мікроорганізмів до фагоцитозу. Препарати цієї групи мають здатність діяти на мікроорганізми не тільки в період росту [25, 82, 88, 189].

Фторхінолони III-IV поколінь, на відміну від фторхінолонів II покоління, блокують ще одну мішень в оболонці бактерій – топоізомеразу 4. Доведено, що цей ензим в основному блокується у грампозитивних бактерій, тоді як ДНК-гіраза – у грамнегативних. Левофлоксацин і моксифлоксацин вважають безпечними, оскільки не впливають на вуглеводний обмін і вони не взаємодіють з іншими препаратами [82, 93].

Зараз появляється все більше даних про використання фторхінолонів для лікування ракових пухлин [219-221].

Усі фторхінолони швидко всмоктуються у шлунково-кишковому тракті ($T_{\max}$ складає 1-3 години), при цьому прийом їжі дещо сповільнює всмоктування препаратів, але не впливає на повноту всмоктування. Максимальна концентрація препаратів у сироватці крові спостерігається через 1-2 години. Фторхінолони досить довго циркулюють в організмі людей (для більшості препаратів $T_{1/2}$ складає 5-10 годин), що дозволяє призначати їх два рази на добу. Зв'язування фторхінолонів із білками плазми крові не перевищує 30%. Фторхінолони добре проникають у рідини і тканини організму, що пов'язано із невисоким ступенем іонізації їх молекул. Ступінь біотрансформації препаратів коливається у межах 10-30%, деякі метаболіти проявляють антибактеріальну активність.

Фармакодинаміка фторхінолонів складається з антибактеріального (бактерицидного), постантибіотичного та імуномодулювального ефектів. Фторхінолони – препарати ультраширокого спектра дії, активні щодо грампозитивних і грамнегативних, аеробних та анаеробних мікроорганізмів, хламідій, мікоплазм, легіонел, мікобактерій. Гриби, віруси, більшість найпростіших резистентні до дії фторхінолонів. Чутливі до дії фторхінолонів грамнегативні палички: ентеробактерії, ешерихії, сальмонели, шигели, вібріони, протей, синьогнійна паличка а також – усі види стафілококів.

Ципрофлоксацин є ефективним препаратом при інфекціях ЛОР-органів (синусит) [27], сечостатевих шляхів [41], нижніх дихальних шляхів, шкіри та м'яких тканин, кісток і суглобів, черевної порожнини. Він випереджає всі фторхінолони за активністю щодо протей. Застосовується для профілактики інфекційних ускладнень та лікування хворих з імуносупресією.

Левовфлоксацин призначають для лікування інфекцій, спричинених чутливими до левофлоксацину мікроорганізмами: гострі синусити, загострення хронічних бронхітів, пневмонії, ускладнені та неускладнені інфекції сечостатевої системи (зокрема пієлонефрити), інфекції шкіри і м'яких тканин.

Моксифлоксацин є фторхінолоном широкого спектра, показаним для лікування інфекцій дихальних шляхів у дорослих, включаючи гострий синусит, загострення хронічного бронхіту, позагоспітальну пневмонію, інфекції шкіри та м'яких тканин. Приводились дослідження з використання моксифлоксацину для лікування ускладнених інфекцій шкіри та м'яких тканин. Його використовують як для перорального, так і для внутрішньовенного введення [3]. У ряді пацієнтів виявлено гіперчутливу реакцію при застосуванні моксифлоксацину [124]. Всі фторхінолони проявляють певну токсичність на організм, зокрема гепатотоксичність [182, 212], однак, незважаючи на те, широко використовуються для боротьби з госпітальною інфекцією [216].

Нещодавно виявлено, що механізм дії моксифлоксацину полягає не тільки в інгібуванні ДНК-гірази та топоізомерази IV таких бактеріальних клітин як *Streptococcus pneumoniae*, але й у багатократному продукуванні в цих клітинах активних форм кисню, зокрема H_2O_2 та гідроксильних радикалів [130].

Щодо впливу фторхінолонів на регуляторні системи клітин пацієнта, то дані надзвичайно обмежені. Так, показано, що ципрофлоксацин інгібує цитокін-індукований синтез такого вторинного месенджера як оксид азоту та володіє імунорегуляторним ефектом [143]. Показано також, що фторхінолони

інгібують індукцибельну та нейрональну NO-синтази [108, 205, 206]. Моксифлоксацин пригнічує внутрішньоклітинну сигналізацію, експресію іNO-синтази та синтез NO в епітеліальних клітинах легень і володіє імуномодуляторними властивостями [188]. Левофлоксацин також інгібує експресію іNO-синтази в клітинах легень [152].

Окрім впливу фторхінолонів на NO-синтазну систему, продемонстрований також їх ефект на антиоксидантний статус клітин пацієнта [102]. Так, моксифлоксацин і норфлоксацин активують такі антиоксидантні ензими як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза в меланоцитах людини [102]. Однак, іншими авторами показано, що такий фторхінолон як енрофлоксацин знижує активність каталази та в цілому не впливає на оксидантний статус крові [142]. У клітинах печінки моксифлоксацин знижує активність каталази, супероксиддисмутази та глутатіон-S трансферази [142, 173, 186]. Одночасно він призводить до зниження рівня відновленого глутатіону та зростання рівня малонового діальдегіду. При ретинопатії, в крові показано, що гатифлоксацин призводить до зниження активності супероксиддисмутази та рівня відновленого глутатіону та паралельного зростання активності каталази, глутатіонпероксидази і глутатіон-S трасферази [142, 173, 186]. Рівень малонового діальдегіду при цьому зростає дозозалежно від концентрації антибіотика.

Окрім впливу на NO-синтазну та антиоксидантну системи, фторхінолони, зокрема ципрофлоксацин, володіють імуномодуляторними властивостями, спричиняють суперіндукцію інтерлейкіну-2 та гамма-інтерферону Т-лімфоцитами, інгібують синтез інтерлейкіну-1 в моноцитах [194]. Моксифлоксацин стимулює секрецію інтерлейкіну-12 у фібробластах та їх проліферацію [119]. Одночасно ципрофлоксацин спричиняє в лімфоцитах крові генотоксичний і цитотоксичний ефекти [95]. Моксифлоксацин впливає на функціонування нейтрофілів і Т-лімфоцитів, модулюючи в них активність Ca^{2+} -транспортувальних систем і генерування активних форм кисню [190].

Таким чином, більшість досліджень демонструють, що фторхінолони модулюють активність NO-синтазної системи та продукування NO, що регулює функціонування клітин. Щодо про-/антиоксидантної дії цих фторхінолонів, то дані часто протилежні, що, ймовірно, обумовлено типом клітин, концентрацією антибіотика, умовами проведення експерименту тощо.

1.3 Морфо-функціональна характеристика лімфоцитів крові

Імунна система є однією з інтегральних систем організму, що дуже швидко реагує на будь-які впливи, а стан імунної реактивності сьогодні розглядається як один із ранніх і чутливих критеріїв несприятливого впливу шкідливих чинників екзо- та ендогенного походження [8, 15, 80].

Імунна система організму є складно організованою системою, з точки зору її функціонування. Ензими імунокомпетентних клітин беруть участь на різних рівнях регуляції, проявляючи специфічний і неспецифічний ефекти. Для імунної реакції характерні всі типи ензиматичної регуляції. У відкритій термодинамічній системі клітини проходять багатостадійні, ланцюгові, хвильові процеси, які забезпечують системність і стадійність адаптивної імунної відповіді клітини (організму). Проте, існують і принципові відмінності ензимології імунокомпетентних систем: їх колосальне біорізноманіття, складний і активно функціональний рецепторний апарат, кооперативні взаємодії, імунна пам'ять. Всі ці процеси забезпечуються ензиматичними системами. Для кожної імунокомпетентної клітини характерні як загальні, так і специфічні каскади ензиматичних процесів. Водночас, показана імуномодуляторна активність деяких ензимів ІКК [15, 20, 44].

Лімфоцити є гетерогенною популяцією клітин і центральною ланкою в специфічних імунних реакціях. Лімфоцити - представники групи незернистих лейкоцитів, що характеризуються специфічним співвідношенням ядерно-цитоплазматичного матеріалу: великі, округлої форми ядра на фоні

незначного об'єму базофільної цитоплазми, яка огортає ядро на зразок перстня.

За функціональними ознаками розрізняють три типи лімфоцитів: В-лімфоцити, Т-лімфоцити, NK-клітини. У крові людини кількість лімфоцитів становить в нормі близько 20-35 % всіх лейкоцитів. Вміст Т-лімфоцитів у крові людини складає 65-80 % від загальної кількості лімфоцитів, В-лімфоцитів – 8-20 %, NK-лімфоцитів – 5-20 % [8, 20].

Характерною особливістю лімфоцитів є те, що за умов значної морфологічної подібності, цим клітинам властива виразна функціональна гетерогенність, яка забезпечує активну участь лімфоцитів у реакціях як клітинного, так і гуморального імунітету.

Існують вікові особливості щодо кількості та функціонування лейкоцитів і лімфоцитів і співвідношення їх субпопуляцій. Так, кількість лейкоцитів у 15-літньому віці у 2,7 раза менша, ніж при народженні, а кількість лімфоцитів в 1,25 раза менша. З віком змінюється фагоцитарна активність лейкоцитів. У дорослих вона зростає в середньому в 5 разів в порівнянні з кількома місячними.

Вважається, що наявність або відсутність певних груп Т лімфоцитів, пов'язана з важливими відмінностями в прогнозі розвитку ряду захворювань [99-101]. Так, Т-лімфоцити відіграють центральну роль в протипухлинному захисті організму. Вони здійснюють протипухлинний захист, шляхом знищення ракових клітин, а також синтезу речовин, що активують інші клітини імунної системи. Т-лімфоцити поділяються на різні типи. Одні Т-лімфоцити вбивають ракові клітини - Т-кілери, інші допомагають останнім вбивати ракові клітини - Т-хелпери. Дослідження парафінізованих тканин підтвердило це положення і показало, що наявність лімфоїдної інфільтрації ПЛ-лімфоцитами (пухлино-інфільтруючі лімфоцити) такими, як CD3⁺ і збільшення кількості цитотоксичних лімфоцитів CD8, пов'язані зі збільшенням тривалості життя пацієнтів. Наприклад, у випадку CD3⁺ ПЛ-ів виявлено, що пацієнти з високою кількістю CD3⁺ клітин жили на 60 місяців

довше за пацієнтів із низьким вмістом цих клітин [213]. Знищення пухлинних клітин здійснюється також натуральними кілерами (НК-клітинами). Використовуючи імуногістохімічне дослідження, автори довели, що пухлини містили також $CD4^+$ і $CD8^+$ клітини, макрофаги становили понад 20% проаналізованих клітин [49, 99].

Лімфоцити швидко реагують на оксидативний стрес [201], а активність ензимів антиоксидантного захисту лімфоцитів може слугувати маркерами на патологічні стани та адаптивні механізми організму [15, 81, 155, 179, 214]

Підсумовуючи вище наведені дані, важливо зазначити, що оскільки внутрішньоклітинний метаболізм лімфоцитів ґрунтується на фізіологічно та біохімічно закріпленій здатності цих клітини швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу в організмі, то модуляція активності ензимів у лімфоцитах настає значно раніше, ніж змінюються їх морфологічні та функціональні показники [52].

Загалом, взаємозв'язок змін субпопуляційного складу та функціональної активності лімфоцитів дає змогу використовувати статус лімфоцитів як “метаболічного дзеркала” організму [15, 42, 44, 99, 135]. Ми припускаємо, що лімфоцити периферичної крові також можуть бути зручною та адекватною моделлю для вивчення особливостей функціонування регуляторних систем клітини при дії антибіотиків та анестетиків, в яких задіяні аргіназо-NO-синтаза та про-/антиоксидантна системи.

1.4 Функціональна характеристика та роль аргінази лімфоцитів крові

Відомо, що аргіназа (*L*-аргінін-амідиногідролаза) (КФ. 3.5.3.1) каталізує гідролітичне розщеплення *L*-аргініну до сечовини і *L*-орнітину [104-106, 112, 128, 162-171, 199]. Крім участі в орнітіновому циклі, аргіназа, як відомо, відіграє важливу роль і в багатьох інших процесах, що відбуваються в різних тканинах живих організмів, зокрема, орнітин є попередником синтезу проліну

- амінокислоти, необхідної для синтезу колагену і поліамінів, ключових компонентів клітинного росту і диференціації, які важливі при загоєнні ран, а також є інгібіторами NO-синтаз [28, 42, 134, 165-171, 204].

В останні роки, цікавість до аргінази була стимульована демонстрацією її участі в метаболізмі оксиду азоту [116, 134, 165-171, 204]. Аргіназа як конкуруючий за субстрат фермент і метаболіти наступного перетворення її продуктів – поліаміни – здатні істотно впливати на активність NO-синтазної реакції.

Аргіназа відноситься до ензимів, які володіють абсолютною специфічністю, діючи тільки на один субстрат. Наприклад, такі подібні з аргініном речовини, як гуанідин і креатин, не підлягають розщепленню аргіназою. Відомо, що аргіназа може слугувати ефективним засобом в ензимотерапії деяких видів раку [134, 167].

Основною функцією аргінази в тваринних організмах є її участь в детоксикації аміаку. Аргіназа, мабуть, є найважливішим ензимом, що регулює швидкість циклу сечовини і забезпечує правильну роботу детоксикації аміаку. Аргіназа позапечінкових тканин підтримує оптимальний рівень L-аргініну в клітинах і може бути одним з факторів, відповідальним за підтримання нормального рівня сечовини в крові у пацієнтів з генетично зумовленими ензиматичними блоками циклу сечовини [162 - 164].

Аргіназа також потенційно регулює аргінін-залежні імунні функції, такі як активація Т-лімфоцитів. Показано, що метаболізм L-аргініну у мієлоїдних супресорах є одним із механізмів регуляції цих клітин. Цей механізм полягає у зміні ензиматичної активності iNOS та аргінази. При цьому, цитокіни Th-2 підвищують активність NO-синтази, а цитокіни Th-2 – аргінази. Таким чином, NO-синтаза та аргіназа можуть діяти роздільно і синергічно *in vivo*, контролюючи специфічні клітинні відповіді Т-клітин [100, 101, 111, 160].

Нині у ссавців ідентифіковано дві ізоформи цього ензиму: аргіназа 1 і аргіназа 2. Ці ізоформи є продуктами генів, які у людини локалізовані в хромосомах 6q23 (аргіназа 1) и 14q24 (аргіназа 2) [162, 163]. Аргіназа 1 типу

знаходиться в цитоплазмі клітин, найбільше - печінки, також виявлена в еритроцитах, в тканині молочної залози в період лактації, в нирках та інших органах. Аргіназа бере участь в детоксикації амонію через уреазний цикл, в опосередкованій макрофагами цитотоксичності. Висока активність ензиму спостерігається в проліферуючих тканинах, у ранах, що гояться проліферуючих лімфоцитах і в пухлинах. Експресія аргінази 1 також відмічається в моноклеарах після травми та хірургічних втручань, що вказує на потенційну роль аргінази в процесах регенерації [180, 200]. Активність аргінази 1 використовують не тільки як маркер ранніх стадій пошкодження печінки, але і як маркер раннього закінчення процесу пошкодження, наприклад, у хворих, яким була зроблена часткова резекція печінки. Підвищення активності аргінази, після операції, свідчить про відновлення функції печінки, причому аргіназа є більш раннім і чутливим маркером, порівняно з амінотрансферазами. Крім того, рівень активності аргінази 1 підвищується при багатьох запальних процесах, що може бути наслідком дії на неї певних медіаторів запалення, а також при алергічних процесах, наприклад, астмі. Аргіназа 1 бере участь в автоімунному запаленні нервових тканин (енцефаломієліті).

Аргіназа 1 експресується в гладком'язових клітинах судин і індукується інтерлейкінами-4 і -13, трансформуючим фактором росту ТФР- β і лізофосфатидилхоліном [207]. Індукція аргінази типу 1 ТФР- β призводить до підвищення конвертування аргініну в пролін і корелює з підвищенням продукції колагену 1. Підвищення експресії аргінази 1 в гладком'язових клітинах аорти в результаті стабільної трансфекції (трансформації) з аргіназою 1, експресування плазмиди або впливу ТФР- β , лізофосфатидилхоліном призводить до збільшення продукції поліамінів і, що більш важливо — до підвищення ступеня проліферації. Інгібування аргінази призводить до зменшення кількості поліамінів. В ряді досліджень з використанням культури ендотеліальних клітин з підвищеним проявом аргінази 1 і 2 виявлено, що аргіназа допомагає регулювати синтез поліамінів

і проліферацію ендотеліальних клітин [160, 161, 170, 217]. Більше того, в другій половині процесу генерації орнітину в ендотеліальних клітинах аргіназа забезпечує утворення проліну, а ступінь перетворення *L*-аргініну в пролін зростає в міру підвищення активності ендотеліальних клітин [217]. Аргіназа є важливим фактором в регуляції синтезу колагену, багатого проліном протеїну, в ендотеліальних і прилеглих клітинах судини. Зростання експресії аргінази під впливом прозапальних цитокінів IL-4 та IL-13 призводить до зростання синтезу орнітину. Небагато *L*-аргінін-опосередкованого орнітину перетворюється в глютамат, ця трансформація збільшується в клітинах із підвищеною активністю аргінази, але ступінь цього перетворення, безсумнівно, недооцінюється, оскільки в ендотеліальних клітинах відбувається активний перерозподіл вуглецевого скелету до інших метаболітів за допомогою трансаміназ [217]. Ці дані демонструють, що активність аргінази може обмежувати проліферацію гладком'язевих клітин і розглядається як фактор регулювання гіперплазії інтими. Недостатня активність аргінази 1 призводить до порушень циклу сечовини, що проявляється зростанням рівня *L*-аргініну в крові – гіпераргінемія. Багаточисельні дослідження показують, що дефіцит аргінази 1 індукує 2 форму аргінази, яка компенсує недостачу першої шляхом регулювання концентрації клітинного *L*-аргініну. У випадках пацієнтів із гіпаргінемією лікування базується на застосуванні дієти багатої на протеїн.

Аргіназа 1 експресується в еритроцитах людини і забезпечує активний процес гемолізу [144, 164, 165]. Підвищення рівня аргінази може призвести до зменшення концентрації *L*-аргініну в циркулюючій крові, що може супроводжуватись зниженням продукції NO і судинною дисфункцією, наприклад при легеневій гіпертензії, цукровому діабеті [164, 165].

Аргіназа 2 типу – ензим мітохондріальної локалізації, який виявлено у різних типах клітин, зокрема у лейкоцитах і лімфоцитах периферичної крові [120, 170, 171, 180]. Фізіологічна роль аргінази 2, зумовлена її участю у численних метаболічних процесах у клітині свідчить про те, що ензим

належить до важливої ланки у розвитку багатьох патологічних станів організму, зокрема автоімунних захворювань. Відомо, що аргіназа модулює імунну відповідь. Показано [101], що гуморальні протизапальні цитокіни IL-4, IL-10, IL-13 и TGF- β спричиняють експресію аргінази. Вважають, що висока експресія аргінази свідчить про гуморальну відповідь з боку імунної системи на антиген.

Експресія аргінази 2 може бути індукована через циклічний АМФ або IL-10. Причиною зростання активності обох ізоформ аргінази можуть бути цитокіни IL-4, -10, 13, TNF- α , TGF- β , які виділяються Т-лімфоцитами і макрофагами у відповідь на хворобу, що розвивається [99, 101, 157].

Було доведено, що наявність внутрішньоклітинного аргініну є лімітуючим фактором синтезу оксиду азоту (NO), хоча, також було показано, що позаклітинні концентрації аргініну відіграють важливішу роль у регуляції синтезу NO порівняно з внутрішньоклітинним аргініном.

1.5 Функціональна характеристика та роль Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові

За фізіологічних умов, синтез оксиду азоту з *L*-аргініну відбувається за участі ізоензимів NO-синтази [163, 165, 167, 171]. В організмі людини NO синтезується за допомогою трьох ізоформ ензиму синтази оксиду азоту (Nitric Oxide Synthase - NOS; КФ 1.14.13.39.): nNOS (так званий тип 1); iNOS (також відома як тип 2), яка, на відміну від nNOS і eNOS, не експресується постійно (конститутивно); синтез цього ензиму відбувається тільки при патологічних станах і може бути індукований в клітинах різних типів при дії запальних стимулів [157]. eNOS (також відома як тип 3), вперше ідентифікована в клітинах ендотелію кровоносних судин.

Ізоензимами NOS є диоксигеназами, що використовують молекулярний кисень і NADPH для трансформації *L*-аргініну в *L*-цитрулін і NO. Всі три ізоформи ензиму мають подібну молекулярну структуру і потребують

наявності тіолзв'язаного гему, NADPH, флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), флавінмононуклеотиду (ФМН), 5,6,7,8-тетрагідробіоптерину, глутатіону [157]. Нейрональна та ендотеліальна NOS активуються при зв'язуванні з кальмодуліном і мають подібну кінетику утворення NO [157]. NO, утворений nNOS і eNOS, забезпечує нейропередачу в нейронах, релаксацію кровоносних судин і гладком'язових органів, пригнічення адгезії і агрегації циркулюючих клітин крові, регуляцію синтезу і секреції гормонів [128]. Активність ендотеліальної та нейрональної NOS залежить від внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Їх наявність є необхідною для прояву активності eNOS та nNOS і не є обов'язковою для індукцибельної ізоформи NOS. Збільшення продукції оксиду азоту відбувається пропорційно надходженню в цитоплазму іонів кальцію. Стимулюючими факторами входження кальцію в клітину і, в такий спосіб, підвищуючи кальцієзалежну активність ензиму є ацетилхолін, серотонін, глутамат, АДФ та інші біологічно активні речовини [162].

Нейрональна та індукцибельна NOS локалізовані у цитозолі, а ендотеліальна ізоформа – мембранозв'язана. Більшість типів клітин організму людини мають одну або декілька ізоформ NOS. Ці ізоензими експресуються як продукти різних генів, локалізованих в окремих хромосомах. Відмінності ко- та посттрансляційних модифікацій можуть впливати на внутрішньоклітинну локалізацію та активність ізоензимів NOS. Регулювання та роль кожної ізоформи NOS у біологічних процесах, на рівні різних тканин, є предметом досліджень, як і розробка селективних і специфічних інгібіторів NOS.

NO розглядають як перший представник нового класу сигнальних молекул, які здійснюють міжклітинну комунікацію і регуляцію багатьох функцій в різних тканинах і системах організму [125, 128, 132, 133]. Зміни інтенсивності синтезу NO притаманні організмам за дії різних факторів і змін умов середовища, оскільки ця багатofункціональна ефекторна молекула в багатьох випадках сприяє адаптації різних систем організму до

шкідливих факторів впливу. Оксид азоту виконує роль нейромодулятора в центральній нервовій системі, а також в нервово-м'язевих синапсах. Впродовж останнього десятиріччя, значна увага приділяється вивченню метаболізму оксиду азоту в патогенезі різноманітних захворювань.

Важливу роль у проліферації пухлинних клітин відіграє метаболізм *L*-аргініну. Перетворення *L*-аргініну в оксид азоту (NO), за допомогою синтази оксиду азоту, або в орнітин, за участі аргінази, є важливими біологічними шляхами. Щодо оксиду азоту, то за різними літературними даними, його концентрація в клітинах зростає при різних патологічних станах, як правило за рахунок активації індукцибельної ізоформи [89, 110, 134].

Таким чином, дослідження особливостей змін активностей NO-синтаз, може слугувати основою для підвищення якості діагностування та ефективності корекції патологічних станів антибіотиками та антисептиками.

1.6 Пероксидація ліпідів і система антиоксидантного захисту клітин

Патологічні процеси, які відбуваються у клітинах, зумовлені, перш за все, порушенням регуляторних систем, активацією процесів пероксидації ліпідів і порушенням системи антиоксидантного захисту [1, 6, 50, 142, 154, 201, 214].

У результаті окисно-відновних реакцій, в організмі тварин постійно проходить генерація активних форм кисню (АФК), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах: регуляції тонусу судин, клітинній проліферації, синтезі простагландинів, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, які контролюють експресію генів, мікробіцидні дії фагоцитів. До АФК належать вільні радикали, продукти неповного відновлення атомарного кисню, а також пероксид водню, синглетний кисень, озон, гіпохлорит, пероксинітрит. За умов фізіологічного стану організму, концентрація АФК у тканинах є невисокою H_2O_2 - 10^{-8} М, O_2^- - 10^{-11} М, OH^- < 10^{-11} М [1, 6, 201, 208].

За дії екстремальних факторів різного походження (хімічне забруднення, іонізуюче випромінювання, гіпер- і гіпоксія, токсичні речовини, запальні процеси), утворення АФК у живих організмів інтенсифікується. За нормальних фізіологічних умов, АФК не нагромаджуються у клітинах. Будь-яка стресова реакція організму, в нормі, супроводжується короткочасним збільшенням кількості АФК. Під дією АФК, у клітинах проходить активація експресії редокс-чутливих генів, багато з яких необхідні для захисту клітин від токсичної дії оксидативного стресу, зокрема глутатіонпероксидази, каталази, супероксиддисмутази, глутатіонредуктази, γ -глутамілцистеїнсинтетази. Одним із проявів токсичної дії метаболітів кисню є інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення. Вільнорадикальне окиснення є універсальним механізмом, за допомогою якого контролюються найважливіші гомеостатичні фізико-хімічні параметри клітини: в'язкість, вибіркова проникність і цілісність клітинних мембран [2, 6, 59].

За участі вільних радикалів відбувається детоксикація чужорідних сполук, що надходять в організм. Радикали й продукти вільнорадикального окиснення впливають на імунітет, структуру й функцію біологічних мембран, акумуляцію й біотрансформацію енергії. Не викликає сумніву, що наявність вільних радикалів в організмі має певне фізіологічне значення. Перебіг багатьох біологічних процесів неможливий без вільних радикалів. Відомо, що вільні радикали відіграють важливу роль у транспорті електронів у дихальному ланцюзі, індукції утворення пор у мітохондріальній мембрані, окисному фосфорилуванні. Окисні процеси, за участю активованих кисневих метаболітів - невід'ємна умова існування живих організмів. Вони виконують функцію між- і внутрішньоклітинних месенджерів, модуляторів та індукторів у біохімічній регуляції й реалізації метаболічних процесів, є найпершою і найбільш мобільною ланкою в адаптаційній перебудові організму при екстремальних впливах. Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення, під дією АФК, призводить до посилення пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), окисної модифікації білків (ОМБ), деструкції нуклеїнових

кислот, вуглеводів, що спричиняє структурні та метаболічні порушення у клітинах [1, 6, 142]. Однією з основних причин пошкодження і загибелі клітини, внаслідок дії АФК, на сьогодні вважається пероксидне окиснення ліпідів [1, 6]. Цим шляхом окиснюються ненасичені жирні кислоти, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран. [6]. Це призводить до змін активності аргіназо-NO-синтазної та іон-транспортних систем і, відповідно, до зміни концентрації NO та Ca^{2+} в клітині, які є внутрішньоклітинними месенджерами і, прямо чи опосередковано, регулюють більшість клітинних функцій [17, 46, 214].

У знешкодженні вторинних продуктів пероксидації та інших окиснених речовин, головну роль відіграють ряд антиоксидантних систем, зокрема, глутатіонова антипероксидна система, як найбільш потужна [142, 154]. Завдяки каталітичній активності глутатіонпероксидази (ГП), в клітинах відбувається відновлення H_2O_2 та гідропероксидів органічних молекул до відповідних гідроксисполук. Цей процес здійснюється з використанням відновленого глутатіону. Глутатіонредуктаза (ГР) – NADPH-залежний фермент, який забезпечує реакцію відновлення окисненої форми глутатіону та, відповідно, рециркулювання GSH. До складу цієї захисної системи також входить глутатіонтрансфераза (ГТ), ензим, що каталізує кон'югацію відновленого глутатіону з електрофільними сполуками і також виконує захисну функцію [142].

Таким чином, відкритим залишається питання не тільки щодо дії антисептиків та антибіотиків на бактеріальні клітини при лікуванні гнійно-ранових поверхонь та інфекційних хвороб, але й на організм пацієнта, його регуляторні системи.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкт досліджень.

В дисертаційній роботі наведено результати біологічного дослідження дії лікарських антимікробних препаратів (декаметоксин, декасан, ципрофлоксацин, левофлоксацин і моксифлоксацин, що застосовують в медичній практиці [4, 18, 29, 70, 72, 74, 82, 93, 127,] та їх впливу на регуляторні системи лімфоцитів периферичної крові людини.

В дослідженнях використовували патентовану субстанцію декаметоксину (ДКМ) (Decamethoxinum®), яку отримували з Дослідного виробництва Інституту органічної хімії НАН України, та його лікарську форму декасан (ДС) («Юрія-Фарм», Київ).

Лікарський засіб Декаметоксин® перереєстровано в Україні безстроково наказом МОЗ України від 29.03.2017 р. № 341. Термін дії реєстраційного посвідчення № UA/12180/01/01 на території України необмежений.

Лікарський засіб Декасан® перереєстровано в Україні 22.12.2016 р. згідно з наказом № 1391 безстроково. Термін дії реєстраційного посвідчення № UA/5364/01/01 на території України необмежений.

Фторхінолони використовували наступні: ципрофлоксацин («Фармацевтична фірма Дарниця», Україна), левофлоксацин (ТОВ «Фірма Старт», Україна) і моксифлоксацин (ТОВ «Юрія-Фарм», Україна).

Музейні та клінічні штами мікроорганізмів використовували Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. Також у дослідженнях використовували лімфоцити та еритроцити крові людини.

Комісією з питань біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН України (протокол № 76а від 20 грудня 2018 р. та протокол № 81 від 25 лютого 2020 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявлено.

2.2 Дослідження антимікробних властивостей декаметоксину

Досліди щодо антимікробіальної дії декаметоксину виконували на *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* M-17, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *B. subtilis* ATCC 6632, отриманих із музею живих культур. Визначали також чутливість клінічних штамів мікроорганізмів *S. aureus*, *S. Epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. Albicans* до ДКМ та ДС. Мікроорганізми мали типові морфологічні, тинкторіальні, культуральні, біохімічні властивості. Чутливість мікроорганізмів до антисептиків вивчали методом двократних серійних розведень. Порівняльну оцінку чутливості мікроорганізмів до досліджуваних препаратів проводили за показником мінімальної бактерицидної та фунгіцидної концентрації (МБцК, МФцК) [12].

2.3 Визначення адгезивних властивостей бактерій за дії декаметоксину

В якості тест-мікроорганізмів використовували музейні штами *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27; *E. coli* M-17, *E. coli* ATCC 25922. Для дослідження застосовували лікарські антисептичні препарати декаметоксин і декасан. Вплив бактеріостатичних (МБсК) і бактерицидних (МБцК) доз досліджували у ДКМ і ДС на адгезію клітин *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17. Дослідження адгезивних властивостей мікроорганізмів проводили за загальноприйнятою методикою з використанням формалінізованих еритроцитів людини О (І) групи Rh (+). Еритроцити застосовували в якості універсальної моделі. Вони несуть на своїй поверхні глікофорин – речовину ідентичну глікокаліксу епітеліальних клітин. Під мікроскопом на 100 еритроцитах розраховували індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) – кількість адгезованих клітин стафілококу, кишкової палички на одному еритроциті, що приймав участь в адгезії. Суттєвими вважали відмінності, які відрізнялись від контролю на 20 %. В контрольних дослідках встановлено участь в адгезії еритроцитів (100%) О (І) групи Rh (+). В

дослідах вивчали дію мінімальних бактеріостатичних концентрацій; мінімальних бактерицидних концентрацій ДКМ і декасану. Показник адгезії в контрольній системі (інтактні клітини) приймали за 100%. Ступінь адгезії в присутності ДКМ чи ДС підраховували відносно контролю [13, 22].

Результати підлягали статистичній обробці загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Визначали середнє арифметичне (M), середню помилку середнього арифметичного (m), критерій достовірності відмінностей (p). Результати вважали достовірними при значеннях $p < 0,05$; $p < 0,01$.

2.4 Дослідження резистентності бактерій до декаметоксину

В роботі проводили дослідження резистентності у штамів *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27; *Candida albicans* 14, *C. albicans* 51) до декаметоксину та декасану [56, 63, 64].

Культури мікроорганізмів ізолювали з однієї мікробної клітини. Тест-культури *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27, *C. albicans* 14, *Candida albicans* 51 володіли типовими морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними ознаками. Стафілококи культивували на м'ясо-пептонному бульйоні, м'ясо-пептонному агарі; *Candida albicans* вирощували на рідкому і твердому середовищах Сабуро. Формування резистентних варіантів до антимікробних препаратів вивчали *in vitro* методом пасажів. За загальновідомими методами визначали мінімальну бактеріостатичну/фунгістатичну концентрацію (МБсК/МФсК) антимікробного препарату на тест-культури. Добові культури штамів стафілококу і штамів *Candida albicans* пересівали на середовища, які містили суббактеріостатичні/фунгістатичні концентрації лікарських препаратів. Матеріалом для подальшого пасажу були культури, які давали ріст на середовищі із найвищою концентрацією препарату. Інтервали між пасажами визначали швидкістю росту культури. Після кожних 5 пасажів досліджували

морфологію, тинкторіальні, культуральні, біохімічні ознаки вихідних і пасажованих варіантів мікроорганізмів. Всього було проведено 30 пасажів мікроорганізмів в присутності кожного лікарського антимікробного препарату [63].

2.5 Аналітичне прогнозування чутливості бактерій до фторхінолонів

Пацієнтам, які лікувались у Вінницькій обласній клінічній лікарні ім. М.І. Пирогова, із гнійно-запальними ускладненнями, внаслідок термічних травм і приймали участь у дослідженні (n=380), проводили традиційне лікування, відповідно до протоколу сучасних загальноприйнятих методів. Хворі серед комплексу лікувальних заходів обов'язково отримували системну та місцеву антимікробну терапію (антибіотики, антисептики).

На початку лікування виконували мікробіологічне обстеження пацієнтів із виділенням чистої культури збудника, його ідентифікацію за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями та вивчали чутливість до антибіотиків, антисептиків. Від хворих з гнійно-запальними вогнищами різної локалізації виділили та ідентифікували 143 штами *S. aureus* (2011 р. – n=37; 2012 р. – n=25; 2013 р. – n=27; 2014 р. – n=26; 2015 р. – n=28). Відповідно до методичних рекомендацій МОЗ України визначали чутливість клінічних штамів *S. aureus* (n=143) до фторхінолонів (ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин) [65, 67].

В ході дослідження проводили математико-статистичний аналіз одержаних даних чутливості клінічних штамів *S. aureus* до фторхінолонів. Використані нами методи статистичної обробки, дали можливість знайти, цілком закономірний, зв'язок між числовими значеннями ознак, що змінювались та ймовірністю реалізації цих значень у масі проведених спостережень [7]. Використовували сучасні методи математичного прогнозування, які передбачали визначення реальної чутливості стафілокока та перенесення отриманих результатів на досліджувану систему, шляхом

побудови серії гіпотетичних нормативних математичних моделей прогнозованої чутливості *S. aureus* до фторхінолонів, методами нормативного аналізу з конкретизацією значень абсолютного та відносного оптимуму.

Прогностичне моделювання реальної чутливості *S. aureus* до фторхінолонів представляло собою сукупність математичних співвідношень (формул), які визначали такі властивості у стафілокока, залежно від їх значень, зовнішніх та початкових умов і часу. Достовірність кожної розробленої математичної моделі, обґрунтування прогнозу чутливості до протимікробних засобів оцінювали за коефіцієнтом детермінації (r^2). Комп'ютерну обробку отриманих даних проводили з використанням ліцензійних пакетів оригінальних програм “STATISTICA 7”; “Matlab 7.11”. Для кожної групи хворих, з інтервалом в один рік, визначали середньоарифметичну величину (M), похибку середньої арифметичної (m), середнє квадратичне відхилення (σ). В ході досліджень за допомогою методів прикладної математики було проведено апроксимацію та інтерполяцію даних і на їх основі вперше отримано аналітичні залежності динамічних прогнозних показників зміни чутливості штамів *S. aureus*, ізольованих від хворих.

2.6 Виділення лімфоцитів периферичної крові

Для виділення лімфоцитів, забір периферичної крові у жінок дослідних груп, проводили після попереднього завершення їхнього клінічного обстеження, перед призначенням їм курсу лікування.

Забір крові, шляхом венепункції, проводився з ліктьової вени у вранішні години, умовах фізіологічного спокою, натще, у кількості 20 мл в пробірки, які стабілізували гепарином (кінцеве розведення 1:100).

Лімфоцити периферичної крові виділяли за методом Boyum A. [109]. Кров, розведену в співвідношенні 1:1 фізіологічним розчином, нашаровували у градієнті густини фікол-тріумбасту ($\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$) й центрифугували 20

хвилин при 500 g. Зняті інтерфазні кільця мононуклеарних клітин двічі відмивали впродовж 10 хвилин фізіологічним розчином [49].

Після останнього центрифугування, до осаду додавали невелику кількість фізіологічного розчину, ресуспензували та, за допомогою трипанового синього, проводили підрахунок кількості живих і мертвих клітин в камері Горяєва [49]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів крові в усіх дослідах становила не менше 95 %.

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентних ензиматичних активностей до суспензії додавали сапонін. Ця методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше [81]. Лімфоцити крові інкубували впродовж 10 хв при помірному струшуванні у розчині, який містив сапонін у концентрації 0,2 % (оптимальна концентрація) [81, 85, 44, 214].

2.7 Визначення аргіназної активності

Активність аргінази лімфоцитів периферичної крові визначали за утворенням сечовини, вміст якої вимірювали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Simko, Україна). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням аліквоти (150 мкл) пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів в інкубаційне середовище наступного складу (мМ): 20 Тріс HCl, 100 L-аргінін, 2 MnCl₂ (pH = 9,5), об'ємом 300 мкл; кількість білка у пробі – 50 – 100 мкг/мл. Інкубацію здійснювали 30 хв, при температурі 37⁰ С на шейкері. Реакцію зупиняли внесенням в інкубаційне середовище 40 мкл 50%-ї трихлороцтової кислоти. У контрольні зразки замість лімфоцитарної суміші вносили відповідну аліквоту фізрозчину. Крім дослідних і контрольних, проб готували також пробу, що містить стандартний розчин сечовини (16,65 мМ). Усі зразки спектрофотометрували проти контрольних при $\lambda=520$ нм. Активність аргінази обчислювали і виражали у нмолях сечовини/хв·мг загального протеїну у пробі [92, 180].

Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції аргінази проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за часом інкубації, кількістю білка лімфоцитарної суміші у пробі та концентрацією субстрату (*L*-аргініну). Уявні кінетичні параметри, такі як максимальна миттєва швидкість реакції V_0 , максимальна (платова) кількість утворення продукту реакції P_{max} та характеристичний час реакції (період напівнасичення) τ визначали як описано в статті [45].

2.8 Визначення активності конститутивної та індукцбельної ізоформ NO-синтази

Визначення NO-синтазної ензиматичної активності сапонін-перфорованих лімфоцитів проводили при 37° С у середовищі інкубації об'ємом 1,5 мл наступного складу: трис-HCl – 0,08 М (рН 7,4), CaCl₂ – 10 мМ, *L*-аргінін – 0,15 мМ, NADPH(H⁺) – 0,12 мМ. Контрольні та безсубстратні зразки (до яких субстрат не вводили) готували аналогічно до дослідних, але вони замість NADPH(H⁺) та *L*-аргініну містили бідистильовану воду. NO-синтазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші (70 мкл); кількість лімфоцитарного протеїну у пробі не перевищувала 50–70 мкг/мл.

Дослідні проби спектрофитометрували проти контрольних та безсубстратних зразків при $\lambda=340$ нм, після чого їх інкубували протягом 20 хв при 37°С. Реакцію зупиняли внесенням до реакційного середовища HClO₄ (1,5 М) [80]. Активність NO-синтази виражали в наномолях окисненого NADPH(H⁺)/хв на 1 мг загального протеїну у пробі.

Активність Ca²⁺-незалежної iNOS визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище селективний інгібітор індукцбельної ізоформи аміногуанідин, замість CaCl₂. Активність Ca²⁺-залежної ізоформи NOS, що згідно з даними літератури, відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS),

розраховували, як різницю між загальною активністю NOS і активністю Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS.

Вивчення кінетичних властивостей NO-синтази проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за складом певних компінентів (концентрація субстрату – *L*-аргініну, час інкубації, вміст білка в лімфоцитарній суміші).

Уявні кінетичні параметри, що характеризують NO-синтазну реакцію – максимальну миттєву швидкість реакції V_0 , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції $P_{\max}$ та характеристичний час реакції τ визначали як описано у статті [45]. Уявні кінетичні параметри, які характеризують NO-синтазну реакцію – уявну константу спорідненості (аффіності) до *L*-аргініну $K_{L\text{-Arg}}$ та максимальну швидкість реакції $V_{\max}$, визначену за *L*-аргініном, розраховували у координатах Лайнуівера-Берка [45, 48, 51].

2.9 Визначення глутатіонпероксидазної активності

Суть методу полягає у розвитку кольорової реакції з 5,5-дітіо-біс(2-нітро-бензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням кольорового продукту тіонітрофенільного аніону (ТНФА), кількість якого прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з ДТНБК [59].

Для визначення глутатіонпероксидазної активності, 0,1 мл суспензії лімфоцитів вносили в 0,8 мл інкубаційного середовища, що готували на 0,1 М трис-HCl буфері (pH 8,0) та містило 2 мМ ЕДТА, 12 мМ NaN_3 , 4,8 мМ GSH. Після 10 хв інкубації, при 37°C, додавали 100 мкл 20 мМ гідро-пероксиду тред бутилу та інкубували ще 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл 20 % ТХО охолодженої. Проби центрифугували 10 хв при 800 g. До 50 мкл супернатанту додавали 5 мл 0,1 М трис-HCl буферу, 50 мкл реактиву Елмана. В контрольні зразки 0,1 мл гемолізату додавали після ТХО. Через 5 хв визначали оптичну густину проб на спектрофотометрі СФ-46 при $\lambda = 412$ нм в 1 см кюветі проти H_2O . Активність ензиму відображали в нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну,

враховуючи молярний коефіцієнт екстинції ТНФА $13,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.10 Визначення глутатіонредуктазної активності

Глутатіонредуктазну активність лімфоцитів периферичної крові визначали спектрофотометрично при $\lambda=340 \text{ нм}$ в $0,2 \text{ М}$ калій-фосфатному буфері ($\text{pH } 7,0$), що містив 2 мМ ЕДТА. На 1 мл об'єму кювети вносили $0,5 \text{ мл}$ калій-фосфатного буферу (30°C), 50 мкл 2 мкМ NADPH, приготовленому на 10 мкМ трис-НСІ буфері ($\text{pH } 7,0$), 50 мкл 20 мкМ GSH. До кінцевого об'єму доводили дистильованою водою. Реакцію ініціювали додаванням до кювети 100 мкл суспензії клітин. Час інкубації становив 10 хв . В якості контролю використовували проби без NADPH, без GSH і без субстрату. ГР-активність виражали в нмолях NADPH/хв на 1 мг протеїну, враховуючи, що молярний коефіцієнт екстинції NADPH $= 6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [154].

2.11 Визначення глутатіонтрансферазної активності

Глутатіонтрансферазну активність лімфоцитів периферичної крові визначали спектрофотометрично при $\lambda=340 \text{ нм}$ в $0,1 \text{ М}$ калій-фосфатному буфері ($\text{pH } 6,5$), що містив 1 мМ ЕДТА 1 мМ 1-хлор-2,4-динітробензол, 5 мМ GSH. Суспензію клітин доводили до $0,4 \text{ мг}$ протеїну на 1 мл реакційного середовища. ГТ-активність розраховували в нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну [5], враховуючи, що молярний коефіцієнт екстинції 1-хлор-2,4-динітробензолу $= 9,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.12 Визначення вмісту відновленого глутатіону

Для дослідження вмісту відновленого глутатіону, використовували інкубаційне середовище (37°C), що містило $0,2 \text{ мл}$ $1,5 \text{ мкМ}$ DTNB у $0,1 \text{ М}$ калій-фосфатному буфері ($\text{pH } 7,0$), $0,2 \text{ мл}$ H_2O . У цю суміш вносили $0,1 \text{ мл}$

суспензії лімфоцитів, перемішували та через 10 хв визначали оптичну густину при $\lambda=412$ нм. Кількість відновленого глутатіону відображали в нмоль GSH/мг протеїну [84].

2.13 Оцінка стану пероксидації ліпідів за визначенням концентрації малонового діальдегіду

Принцип методу визначення МДА полягає в тому, що при високій температурі в кислому середовищі він реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, створюючи забарвлений триметиленовий комплекс з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм [83].

Для кількісного визначення МДА до 0,2 мл суспензії клітин додавали 3 мл дистильованої води, 0,5 мл KmgO_4 , суміш перемішували і через 10 хв додавали 0,5 мл FeSO_4 . Через 5 хв реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20 % розчину ТХО.

Після центрифугування, впродовж 15 хв, при 200 g надосадкову рідину по 2 мл переносили в пробірки, додавали по 0,5 мл розчину HCl , 1 мл 0,8 % розчину тіобарбітурової кислоти і залишали на 20 хв в киплячій водяній бані. Як контроль використовували проби, що містили 2 мл дистильованої води. Після появи рожевого забарвлення проби охолоджували до кімнатної температури, додавали 3 мл бутанолу і центрифугували 15 хв при 800 g.

Оптичну густину вимірювали при $\lambda=532$ нм проти контрольної проби. Розрахунок вмісту МДА проводили використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [83].

2.14 Визначення концентрації протеїну

Вміст протеїну у лімфоцитарній суміші визначали за модифікованим методом Лоурі [149], який базується на вимірюванні інтенсивності забарвлення розчину внаслідок проходження двох біохімічних реакцій:

біуретової та реакції реактиву Фоліна. Реактив А: 0,1 н. NaOH; 2%- Na₂CO₃ в 0,1 н. NaOH. Реактив В: 0,5 % CuSO₄·5H₂O в 1 %-му виннокислоу натрію або калію. Реактив С: перед початком аналізу 1 мл реактиву В змішують з 49 мл реактиву А. У пробірки вносять досліджуваний розчин, який містив 10 – 100 мкг білка, доводили дистильованою водою до 0,4 мл, додавали 2 мл реактиву С, перемішували та інкубували при кімнатній температурі 20 хв. Потім додавали 0,2 мл реактиву Фоліна, змішували та інкубували упродовж 30 – 40 хв за кімнатної температури. Вимірювання абсорбції проводили на однопроменевому спектрофотометрії СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 750$ нм. Значення концентрації протеїну знаходили по калібрувальному графіку. В якості етанолу використовували бичачий сироватковий альбумін (Sigma, США).

2.15 Статистична обробка даних

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку (m) та середнє квадратичне відхилення (σ). Достовірність змін встановлювали за t -критерієм Ст'юдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали рівними 0,95, 0,99 та 0,999.

Результати представлені як середнє арифметичне (M) $\pm$ стандартна похибка середнього (m). Кількість дослідів (n) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували лімфоцити крові від одного пацієнта або практично здорового донора).

Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує еспериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції r становило 0,90 – 0,98. Достовірність

розрахованих параметрів прямої перевіряли за F -критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію за якої $p \leq 0,05$ [48, 51].

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ФТОРХІНОЛОНІВ

3.1 Антимікробна дія декаметоксину.

Незважаючи на значну кількість досліджень, в Україні, антисептичного лікарського засобу декаметоксин (ДКМ), вивчення його мікробоцидних, фізико-хімічних і, особливо, біохімічних властивостей, залишається актуальною проблемою. Слід зазначити, що зарубіжних досліджень даного лікарського засобу практично не існує.

У результаті проведених досліджень, встановлено, що ДКМ і його лікарська форма ДС проявляли однакову мікробоцидну активність щодо музейних штамів *E. coli* (15,62 мкг/мл), *C. albicans* (16 мкг/мл), *E. faecalis* (0,97 мкг/мл), *Bac. subtilis* (0,24 мкг/мл). ДС був менш мікробоцидно активним щодо *S. aureus* (0,48 мкг/мл) у порівнянні з ДКМ (0,24 мкг/мл) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Мікробоцидна активність генеричного декаметоксину (ДКМ) та його лікарської форми дексану (ДС) на музейні штами мікроорганізмів

Музейний штам мікроорганізму	Декаметоксин (мкг/мл), $M \pm m$	
	ДКМ	ДС
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,24±0,02	0,48±0,03*
<i>E. coli</i> M-17	15,62±0,09	15,62±0,09
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15,62±0,09	15,62±0,09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	62,5±4,3	250±15,6*
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,97±0,07	0,97±0,08
<i>B. subtilis</i> ATCC 6632	0,24±0,02	0,24±0,02
<i>C. albicans</i> CC M 855	0,24±0,03	0,24±0,03

Примітка: * $p < 0,05$

Також ДС був менш мікробіцидно активним щодо *P. aeruginosa* (250 мкг/мл), ніж ДКМ (62,5 мкг/мл). Однак обидві субстанції, відповідно до інструкції із застосування лікарських форм ДКМ®, не рекомендовано для профілактики та лікування інфекційних ускладнень, спричинених *P. aeruginosa*, тому це не впливає на ефективність антимікробних засобів згідно з інструкцією із застосування. Невідповідність у бактерицидній дії ДКМ і ДС щодо *S. aureus* ATCC 25923 та *P. aeruginosa* і те що ДКМ у 2 – 4 рази активніший щодо цих штамів свідчить, що виробникам необхідно провести відповідні заходи щодо покращення якості для досягнення мікробіцидної активності препарату на рівні патентованого взірця ДКМ®.

Аналіз результатів дослідження чутливості клінічних штамів мікроорганізмів до ДКМ та ДС показав високу бактерицидну дію на штами *S. epidermidis* (від $(1,16 \pm 0,14)$ до $(1,45 \pm 0,15)$ мкг/мл); *S. aureus* (від $(1,19 \pm 0,59)$ до $(1,52 \pm 0,67)$ мкг/мл); *E. coli* (від $(15,62 \pm 1,3)$ до $(18,46 \pm 1,8)$ мкг/мл); *P. Aeruginosa* (від $(36,5 \pm 7,91)$ до $(39,48 \pm 6,85)$ мкг/мл), фунгіцидну дію на *C. albicans* (від $(13,39 \pm 1,12)$ до $(15,63 \pm 1,13)$ мкг/мл) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Мікробіцидна активність генеричного декаметоксину (ДКМ) та його лікарської форми дексану (ДС) на клінічні штами мікроорганізмів

Клінічний штам мікроорганізму	Декаметоксин (мкг/мл), $M \pm m$	
	ДКМ	ДС
<i>S. aureus</i> (n = 65)	$1,19 \pm 0,59$	$1,52 \pm 0,67$
<i>S. epidermidis</i> (n = 15)	$1,16 \pm 0,14$	$1,45 \pm 0,15$
<i>E. coli</i> (n = 14)	$15,62 \pm 1,3$	$18,46 \pm 1,8^*$
<i>P. aeruginosa</i> (n = 19)	$36,50 \pm 7,91$	$39,48 \pm 6,85$
<i>C. albicans</i> (n = 9)	$13,39 \pm 1,12$	$15,63 \pm 1,13^*$

Примітка: $*p < 0,05$

Встановлено, що ДС мав дещо нижчу антимікробну активність, порівняно з ДКМ. В цілому дослідження протимікробної активності показали їх високу протимікробну ефективність.

Висновок. Обидва препарати ДКМ і ДС мікробіцидно діють на стафілококи, ентерококи, кишкову паличку та *Candida albicans*. Проте патентований вірець ДКМ за мікробіцидною дією переважає ДС.

3.2 Вплив декаметоксину на адгезію бактерій

Відомо, що однією з ранніх стадій інфекційного процесу є адгезія збудника в тканинах. Адгезія та колонізація служать пусковими механізмами інфекційного процесу [13, 22, 38, 77]. Мікроорганізми, активно долаючи природні захисні бар'єри макроорганізму, прикріплюються до поверхні клітин шкіри, слизових оболонок за допомогою адгезинів, що взаємодіють з клітинами макроорганізму. Специфічна адгезія відбувається внаслідок молекулярної взаємодії між адгезинами мікробної клітини та рецепторами клітин господаря (ліганд-рецепторна взаємодія). Адгезини належать до поверхневих структур мікробних клітин, до складу яких входять макромолекули лектинів, протеїнів і здатні зв'язувати карбогідрати. Рецептори адгезинів знаходяться на поверхні клітин у вигляді протеїнових фрагментів [13, 53].

Бактерії можуть прикріплюватися до клітин макроорганізму завдяки наявності пілей, лектиноподібних структур, водневих зв'язків, сил Ван-дер-Ваальса, а також електростатичної взаємодії. Лікарські антисептичні засоби мають властивість інактивувати біохімічні, фізіологічні процеси мікроорганізмів. Антимікробні препарати здатні порушувати життєдіяльність збудників інфекційних захворювань завдяки ефективним механізмам впливу. Зокрема, вони спричиняють порушення структури клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани та структур, які приймають участь в адгезії мікроорганізмів; порушенні синтезу білка в рибосомах; блокуванні процесів

метаболізму в збудників; порушенні реплікації, синтезу нуклеїнових кислот в клітинах мікроорганізмів.

На підставі результатів досліджень встановлено, що ДКМ та ДС в різних бактеріостатичних (МБсК) і бактеріоцидних (МБцК) концентраціях суттєво діяли на адгезивну здатність стафілококів та ешерихій (табл. 3.3 – 3.4).

Таблиця 3.3

Показники дії декаметоксину на адгезію стафілококів та ешерихій

Мікро-організ-ми	Контроль			Дослід (МБсК)				Дослід (МБцК)			
	Кіль-ть бакте-рій на 100 ер.	ІАМ*	%	Доза препа-рату, мкг/мл	Кіль-ть бакте-рій на 100 ер.	ІАМ*	%	Доза препа-рату, мкг/мл	Кіль-ть бакте-рій на 100 ер.	ІАМ*	%
S. aureus ATCC 25923	518	5,18	100	0,96	310	3,10	59,84	1,90	136	1,36	26,25
S. aureus 27	517	5,17	100	0,48	298	2,98	57,64	3,80	126	1,26	24,37
E. coli ATCC 25922	524	5,24	100	1,90	358	3,58	68,32	7,60	128	1,28	24,42
E. coli M-17	526	5,26	100	3,80	348	3,48	66,15	15,20	116	1,16	22,05

*- кількість адгезованих клітин стафілококу, кишкової палички на одному еритроциті, який приймав участь в адгезії.

В контрольних дослідах клітини грампозитивних (стафілокок), грамнегативних (ешерихії) бактерій у 100 % адгезувались на формалінізованих еритроцитах людини. Доведено, що в присутності МБсК антисептиків відсоток адгезованих бактеріальних клітин стафілококів зменшився в присутності ДКМ (0,48–0,96 мкг/мл) на 57,64–63,07 % відповідно; в присутності декасану (1,9 мкг/мл) 58,46–59,60 %, відповідно.

Таблиця 3.4

Показники дії декасану на адгезію стафілококів та ешерихій

Мікро-організми	Контроль			Дослід (МБсК)				Дослід (МБцК)			
	Кіль-ть бактерій на 100 ер.	ІАМ*	%	Доза препарату, мкг/мл	Кіль-ть бактерій на 100 ер.	ІАМ*	%	Доза препарату, мкг/мл	Кіль-ть бактерій на 100 ер.	ІАМ*	%
S. aureus ATCC 25923	500	5,0	100	1,90	298	2,98	59,60	3,80	114	1,14	22,80
S. aureus 27	496	4,96	100	1,90	290	2,90	58,46	3,80	110	1,10	22,17
E. coli ATCC 25922	396	3,96	100	3,80	310	3,10	78,28	15,20	105	1,05	26,51
E. coli M-17	389	3,89	100	3,80	296	2,96	76,09	15,20	103	1,03	26,48

*- кількість адгезованих клітин стафілококу, кишкової палички на одному еритроциті, який приймав участь в адгезії

Встановлено, що в присутності мінімальних бактериостатичних концентрацій лікарських препаратів відсоток бактеріальних клітин ешерихій, стафілококів суттєво зменшився у присутності ДКМ (3,8 мкг/мл) на 31,68–42,36 % відповідно; декасану (3,8 мкг/мл) на 21,72 – 41,54 %, відповідно.

Доведено, що мінімальні бактерицидні концентрації лікарських антибактеріальних препаратів значно інтенсивніше пригнічували адгезивний процес ешерихій в наступних межах. В присутності ДКМ (7,6–15,2 мкг/мл) пригнічували адгезію ешерихій на 22,05–24,42 %), декасан (15,2 мкг/мл) 26,48–26,51 %, відповідно.

Висновок. Антисептичні препарати ДКМ та ДС ефективно діють на адгезини стафілококів та ешерихій. Доведено, що ДКМ і ДС в досліджуваних МБсК (0,48–3,8 мкг/мл), МБцК (7,6–15,2 мкг/мл) забезпечують потужну дію на адгезини бактерій, що може спричиняти високий профілактичний і

лікувальний ефекти в процесі застосування цих лікарських антимікробних засобів.

3.3 Характеристика резистентності мікроорганізмів до декаметоксину

Формування мікроорганізмами стійкості до лікарських антисептичних препаратів потрібно розглядати як універсальне біологічне явище, що забезпечує збереження цих видів у несприятливих умовах існування [63]. Збудники інфекційних хвороб людини володіють природною здатністю набувати резистентність до різних фізичних, хімічних, біологічних факторів та чинників. Антисептикорезистентність бактерій обумовлена змінами в геномі бактеріальної клітини як результат мутацій. Резистентність до антисептиків, як правило, формується в процесі взаємодії з цими препаратами. Внаслідок селективної дії антимікробних засобів, відбувається елімінація чутливих мікробів їхньої популяції та розмноження, резистентних до ліків, варіантів збудників захворювань [60, 63, 198].

В результаті проведених досліджень встановлено, що штами стафілококів повільно формували стійкість до ДКМ. Після п'яти пасажів резистентність двох штамів стафілококу збільшилась у два рази, після 10 пасажів – у чотири рази, після 15 пасажів – у 8 разів, після 20 пасажів – у 8-16 разів, після 25 пасажів – у 32 рази. 30-ти кратне пасажування показало, що резистентність до ДКМ у *S. aureus* ATCC 25923 зросла в 64 рази, а в *S. aureus* 27 – у 32 рази (табл. 3.5).

Отримані дані свідчать, що резистентність штамів стафілококу до ДКМ формувалась в результаті багатоступеневих мутацій. Встановлено, що чутливість штамів стафілококу до ДКМ за присутності мінімальних бактерицидних концентрацій (МБцК) знаходилась в межах 3,9-7,8 мкг/мл, які забезпечували ефективне застосування в клініці.

Відомо, що крім бактерій (стафілококи, стрептококи, коринебактерії) з високою чутливістю до лікарських антисептичних засобів, які містять в молекулі чотирьохвалентний азот, існують інші мікроорганізми- з природною чутливістю до цих препаратів. До них належать *Candida albicans*, які мають інші біологічні ознаки, тому було цікаво дослідити формування резистентності у штамів *Candida albicans* до препаратів ДКМ.

Таблиця 3.5

Мікробіологічна характеристика формування резистентності у штамів стафілококу до декаметоксину в процесі пасажування

Пасажі	S. aureus ATCC 25923		S. aureus 27	
	МБцК, мкг/мл	Кратність до контролю	МБцК, мкг/мл	Кратність до контролю
Вихідна чутливість (контроль)	0,12	-	0,12	-
Чутливість після 5 пасажів	0,24	2	0,12	-
Чутливість після 10 пасажів	0,48	4	0,48	4
Чутливість після 15 пасажів	0,96	8	0,96	8
Чутливість після 20 пасажів	1,95	16	0,96	8
Чутливість після 25 пасажів	3,90	32	3,90	32
Чутливість після 30 пасажів	7,80	64	3,90	32

Доведено, що резистентність до ДКМ у *Candida albicans* формувалася повільно. Так, після 30 пасажів на поживних середовищах в присутності ДКМ стійкість у *Candida albicans* зросла в 16 разів (табл. 3.6).

Показано, що в процесі формування резистентності до ДКМ мали місце зміни морфології мікроорганізмів з утворенням поліморфних мікробних

клітин. Резистентні біовари стафілококу втрачали здатність утворювати золотисті пігменти. На твердих поживних середовищах повільно (2-3 доба) утворювали в 2 рази дрібніші колонії в порівнянні з колоніями в контрольних посівах без антисептиків. В процесі формування резистентності, штами стафілококу втрачали здатність утворювати гемолізину, лецитовітелазу; повільно гідролізували вуглеводи, багатоатомні спирти, порівняно з контрольними дослідями.

Таблиця 3.6

Мікробіологічна характеристика формування резистентності у штамів *Candida albicans* до декаметоксину

Пасажі	C. albicans 14		C. albicans 51	
	МФЦК, мкг/мл	Кратність до контролю	МФЦК, мкг/мл	Кратність до контролю
Вихідна чутливість (контроль)	1,95	-	3,90	-
Чутливість після 5 пасажів	1,95	-	3,90	-
Чутливість після 10 пасажів	3,90	2	7,80	2
Чутливість після 15 пасажів	3,90	2	7,80	2
Чутливість після 20 пасажів	7,80	4	15,60	4
Чутливість після 25 пасажів	15,60	8	31,25	8
Чутливість після 30 пасажів	31,25	16	62,50	16

Встановлено, що дослідні штами *Candida albicans*, в процесі формування резистентності до ДКМ, змінювали морфологію, культуральні властивості на середовищах з антисептиком. Характеризувались повільним ростом. Мікроскопічно визначали поліморфні за формою та розмірами клітини грибів (гігантські, сигароподібні клітини, ниткоподібні форми). Резистентні штами грибів проростали в два рази повільніше, ніж контрольні культури. На

щільному поживному середовищі Сабуро відмічали дисоціацію штамів *Candida albicans* з гладеньких (S-форма) в шорсткі (R-форма) колонії. Важливо підкреслити, що штами *Candida albicans* повільніше (6-7 доба) ферментували вуглевди, ніж в контролі (24-28 годин). На лікувальну та профілактичну активність ліків можуть впливати технологія виготовлення лікарських препаратів, їх склад, лікарська форма (таблетки, капсули, розчини, мазі і т. ін.), тому цікаво було дослідити формування резистентності мікроорганізмів до ДС.

Результати дослідження формування стійкості до лікарських форм ДКМ показало, що *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27 формували резистентність до ДС, яка зросла в 4-8 разів (1,95 мкг/мл) після 10 пасажів культивування (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Мікробіологічна характеристика формування резистентності у штамів стафілококу до декасану

Пасажі	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> 27	
	МФсК, мкг/мл	Кратність до контролю	МФсК, мкг/мл	Кратність до контролю
Вихідна чутливість (контроль)	0,12	-	0,12	-
Чутливість після 5 пасажів	0,48	4	0,24	2
Чутливість після 10 пасажів	0,96	8	0,48	4
Чутливість після 15 пасажів	1,95	16	0,96	8
Чутливість після 20 пасажів	3,90	32	0,96	8
Чутливість після 25 пасажів	3,90	32	3,90	32
Чутливість після 30 пасажів	7,80	64	7,80	64

Після 20 пасажів стійкість стафілококів до ДС зростала в 16 разів (МБсК – 3,90 мкг/мл); після 30 пасажів зросла в 64 рази, відповідно. МБсК ДС при цьому не перевищувала – 7,80 мкг/мл.

В наступних дослідженнях формування резистентності штамів *C. albicans* 14, *C. albicans* 51 до ДС доведено, що їх стійкість збільшилась після 10 пасажу у 8 рази, після 20 в 16 разів (МФсК 15,6 мкг/мл). Після 30 пасажів тест-штами *C. albicans* були в 32 рази стійкішими порівняно з вихідним рівнем, а МФсК щодо досліджуваних кандид становили 62,50 мкг/мл, що свідчить про достатню діючу концентрацію лікарського антисептичного препарату ДС для профілактики, лікування кандидозної інфекції (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Мікробіологічна характеристика формування стійкості у штамів *C. albicans* до декасану.

Пасажі	C. albicans 14		C. albicans 51	
	МФцК, мкг/мл	Кратність до контролю	МФцК, мкг/мл	Кратність до контролю
Вихідна чутливість (контроль)	1,95	-	1,95	-
Чутливість після 5 пасажів	7,80	4	3,92	2
Чутливість після 10 пасажів	15,60	4	3,90	2
Чутливість після 15 пасажів	15,60	4	7,80	4
Чутливість після 20 пасажів	31,25	8	15,60	8
Чутливість після 25 пасажів	62,50	16	31,25	16
Чутливість після 30 пасажів	62,50	32	62,50	32

Висновок. Лікарські препарати декаметоксин та декасан проявляють високі протимікробні властивості до штамів стафілококів, *Candida albicans*.

Доведено, що у стафілококів, *C. albicans* повільно формується стійкість *in vitro* до декаметоксину та декасану, яка після 30 пасажів збільшується у 16-64 рази. В процесі формування резистентності у стафілококів, *C. albicans* має місце значне пригнічення їх біологічних властивостей, що ймовірно зумовлено порушенням функціональної активності ензимів мікробних клітин.

3.4. Антимікробна властивість фторхінолонів

Прогресуюча поліантибіотикорезистентність в межах популяції; на рівні медичних закладів спонукає до глибокого дослідження проблеми стійкості стафілокока до різних груп антибіотиків. В сучасних умовах, доцільним залишається вивчення чутливості *S. aureus* до фторхінолонів, які є препаратами резерву і постійно застосовують в лікуванні важкохворих з гнійно-запальними захворюваннями [220].

В результаті проведеного комплексного математико-статистичного аналізу результатів мікробіологічного дослідження чутливості клінічних штамів *S. aureus* до ципрофлоксацину, встановлено низьку чутливість цих бактерій у 2011 р. (44 %). При подальшому аналізі результатів за період 2011-2015 р. отримали математичну формулу (1), яка описує тенденцію чутливості *S. aureus* до ципрофлоксацину у вигляді параболічної функції. Помірне відновлення чутливості клінічних штамів золотистого стафілококу до ципрофлоксацину відбувалось до 2014 р. (80 %). Проте, математична екстраполяція попередньої закономірності, в майбутньому свідчить про зниження чутливості золотистого стафілококу до ципрофлоксацину (рис. 3.1).

$$\text{Ципрофлоксацин} = a + b \cdot x^3 + c/x^2,$$

де $a=5357653$; $b= - 0.00026230709$; $c= -1.3039612 \cdot 10^{13}$; $r=0.99937$; похибка 0.065 %.

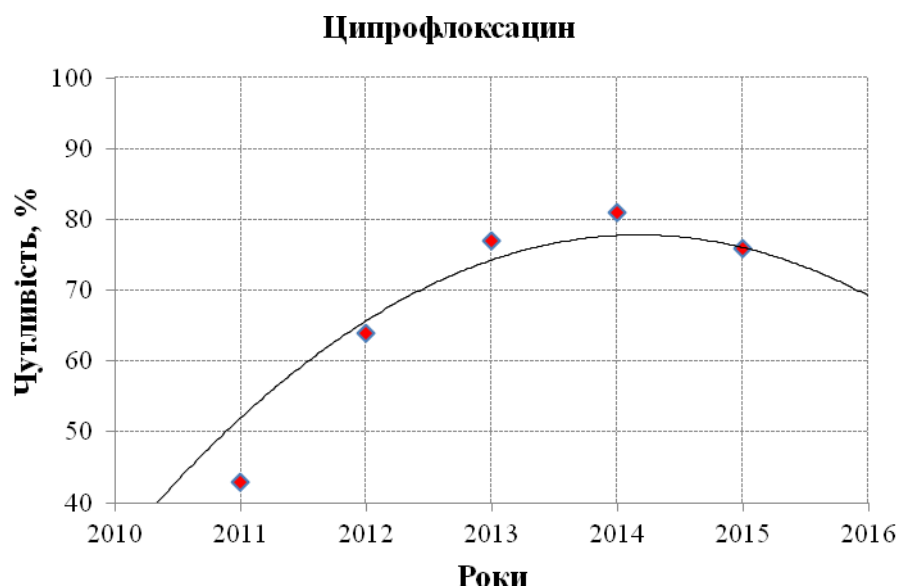


Рис. 3.1. Прогностична характеристика динаміки чутливості *S. aureus* до ципрофлоксацину.

Прогностичний аналіз згладженого ряду показників чутливості до левофлоксацину за період 2011 – 2015 рр. показав, що динаміка даного показника в клінічних штамів *S. aureus* має лінійно зростаючий характер (рис. 3.2).

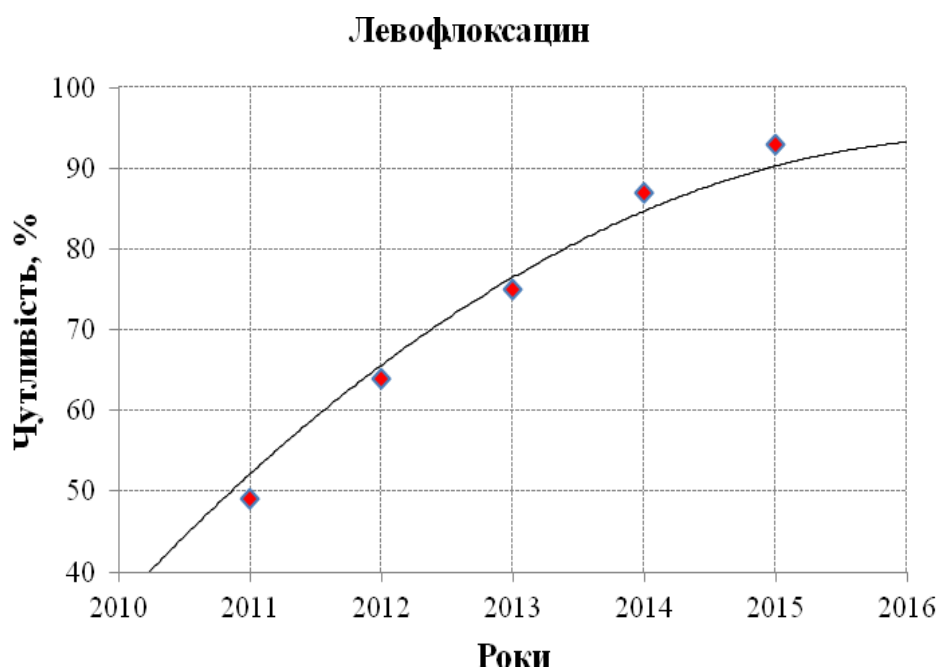


Рис. 3.2. Прогностична характеристика динаміки чутливості *S. aureus* до левофлоксацину.

Левифлоксацин = $a+b \cdot x^3+c \cdot x^3+d/x^2$, де $a= -3.458383 \cdot 10^9$; $b=1718774.4$; $c= -0.084905691$; $d=2.8003234 \cdot 10^{15}$, $r^2=0.998$; похибка 0,2 %.

У дослідженні спостерігали поступове зростання кількості чутливих до левифлоксацину штамів золотистого стафілококу (94,11 % у 2015 р.). Така тенденція свідчить про позитивний короткотривалий прогноз щодо антистафілокової ефективності левифлоксацину.

Прогнозування рівня чутливості золотистого стафілококу, який колонізував опікові рани, вказує на тенденцію поступового відновлення чутливості до моксифлоксацину. Очікувані значення чутливості до моксифлоксацину (92,5 %) ще раз свідчать про можливу неефективність застосування фторхінолонів без попереднього мікробіологічного визначення їх чутливості (рис. 3.3).

Моксифлоксацин = $a+b \cdot x \cdot \ln(x)+c/x^2$, де $a=5562626.3$; $b= -231.76139$; $c= -8.1643381 \cdot 10^{12}$; $r^2=0.997$; похибка 0.3 %.

Аналіз багаторічного дослідження чутливості золотистого стафілококу до моксифлоксацину демонструє позитивну динаміку. Це свідчить про очікувані перспективи ефективної профілактики, лікування моксифлоксацином стафілокової інфекції у важкохворих з опіками.

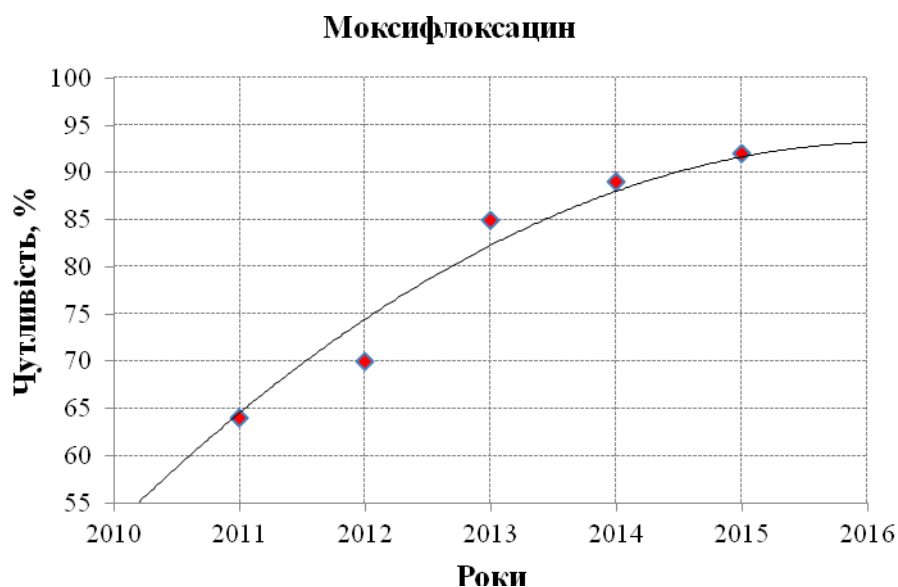


Рис. 3.3. Прогностична характеристика динаміки чутливості *S. aureus* до моксифлоксацину.

Висновок. За результатами проведених досліджень, вперше отримані прогностичні аналітичні вирази динаміки чутливості до фторхінолонів клінічних штамів *S. aureus*, які спричиняли у хворих з важкими опіками гнійно-запальні ускладнення. У клінічних штамів золотистого стафілококу прогнозована чутливість до ципрофлоксацину має тенденцію до зниження, а до левофлоксацину - зростання. Високою є чутливість *S. aureus* до моксифлоксацину (92,5 %).

Матеріали даного розділу, представлені у публікаціях:

1. Палій ГК, Назарчук ОА, Нагайчук ВІ, Осадчук НІ, Палій ДВ, Коваленко ІВ. Аналітичне прогнозування чутливості стафілококу до фторхінолонів. Світ медицини та біології. 2015. 3(51):104-7.
2. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Яцула ОВ, Буркот ВМ. Дослідження дії декаметоксину та його лікарських форм на адгезію бактерій. Світ медицини та біології. 2015;4(52):103-6.
3. Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Гончар ОО, Яцула ОВ. Мікробіологічна характеристика резистентності мікроорганізмів до антисептичних препаратів. Вісник проблем біології і медицини. 2015;2(125):282-6.
4. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Буркот ВМ. Антимікробні властивості генериків декаметоксину. Медична та клінічна хімія. 2015;4(61):43-6.
5. Палій ГК, Назарчук ОА, Бобир ВВ, Гончар ОО, Гридін ТЯ, Палій ДВ, та ін. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків. Мікробіологія і біотехнологія. 2015;4(32):67-74.
6. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Яцула ОВ. Вивчення антимікробних властивостей лікарських антисептичних препаратів, що містять декаметоксин. Український біофармацевтичний журнал. 2016;1(42):74-8.

7. Палій ДВ, Яцула ОВ, Дудар АО, Коваленко ІВ. Вивчення антимікробних препаратів на адгезивні властивості бактерій. Вісник проблем біології і медицини. 2016;2(128):174-7.
8. Палій ДВ, Коваленко ІВ, Салдан ЮЙ, Гончар ОО. Властивості збудників інфекційних захворювань і їх чутливість до антибіотиків, антисептиків. Матеріали всеукраїнської наук.-практ. конф. за участю міжнародних спеціалістів. Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями; 2015 трав. 14-15; Харків; 2015, с. 46.
9. Гончар ОО, Коваленко ІВ. Оцінка формування резистентності у мікроорганізмів до антибіотиків і антисептиків. Матеріали VI міжнародної наук.-практ. конф. молодих вчених; 2015 трав. 15; Вінниця; 2015, с. 38.
10. Назарчук ОА, Коваленко ІВ. Аналіз ефективності сучасних антибіотиків, антисептиків щодо збудників госпітальної інфекції. Матеріали щорічної 12-ої наук.-практ. Конф. з міжнародною участю приуроченої до Дня науки, 75-річчя інституту, 105-річчя Г.С.Мосінга; 2015 трав. 21-22; Львів; 2015, с. 113-14.
11. Paliy D, Nazarchuk O, Gonchar O, Saldan Yu, Kovalenko I.V. Microbiology study of modern antiseptic remedies. Abstracts of the International conference for young scientists. Actual problems of microbiology and biotechnology; 2015 Jun 1-4; Odesa; 2015, с. 43.
12. Nazarchuk OA, Nahaichuk VI, Saldan YuJ, Kovalenko IB, Burkot VM. The research of the qualities in non-enzymatic bacteria, isolated from patients with infectious complications. Abstracts book of the II International scientific conference. Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century; 2016 Apr 14-15; Kyiv; 2016, с. 79-80.
13. Зарицький ОО, Коваленко ІВ. Дослідження антисептичних препаратів у пацієнтів з інфекційними ускладненнями після травми. Матеріали Міжнародної наук. конф. студентів та молодих вчених. Перший крок в науку – 2017. 2017 квіт. 26-28; Вінниця; 2017, с.35.

РОЗДІЛ 4.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ФТОРХІНОЛОНІВ НА АРГІНАЗА/NO-СИНТАЗНУ СИСТЕМУ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ

4.1. Активність аргінази лімфоцитів крові за дії декаметоксину та фторхінолонів

Аргіназа – металоензим, що каталізує гідроліз *L*-аргініну до *L*-орнітину та сечовини [33, 100, 111, 116, 158, 160, 161, 171]. Дослідження активності аргінази в практично здорових осіб і при різних патологічних станах організму у клітинах, зокрема лімфоцитах периферичної крові, є незначними та обмеженими. Практично відсутні дані щодо змін активності аргінази при дії антисептиків, зокрема декаметоксину та в меншій мірі антибіотиків фторхінолонового ряду.

Оскільки декаметоксин володіє гідрофільними та ліпофільними властивостями [70], він через ранові поверхні, слизові оболонки, шкіру тощо може проникати в клітини, кров, розноситись кров'ю до різних органів і тканин і, таким чином, спричиняти різноманітні біохімічні ефекти, зокрема щодо регуляторної NO-синтазної системи клітин. У цьому плані біологічна дія декаметоксину практично не досліджена.

При визначені оптимальних концентрацій субстратів для функціонування аргінази в лімфоцитах периферичної крові та з'ясування ряду кінетичних параметрів для ензиматичної реакції аргінази *L*-аргінін вносили в середовище інкубації в діапазоні концентрацій від 1 до 200 мМ (за сталої оптимальної концентрації Mn^{2+} - 2 мМ).

Декаметоксин у концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності. При 10^{-5} М концентрації препарату – в 1,2 , а при 10^{-2} М концентрації до $(175,1 \pm 8,8)$ нмоль сечовини/хв·мг протеїну, тобто в 1,4 раза щодо контролю ($p < 0,05$) (рис. 4.1).

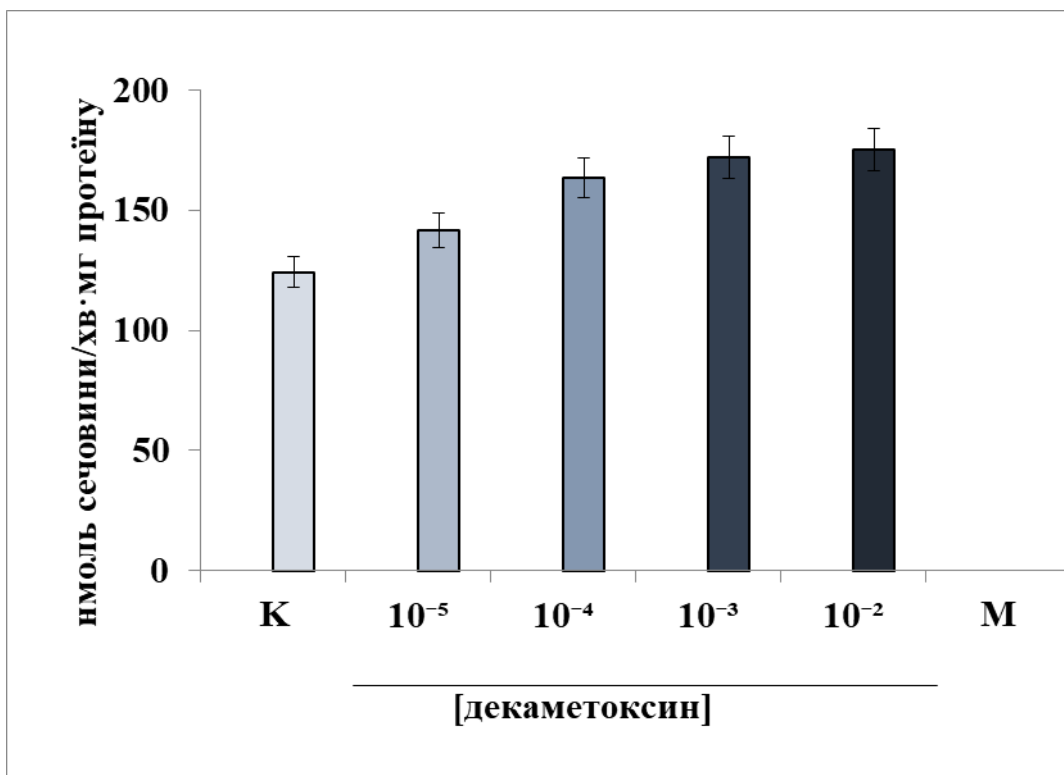


Рис. 4.1. Аргіназна активність лімфоцитів крові за дії різних концентрацій декаметоксину ($M \pm m$, $n=6$).

При дії на лімфоцити крові фторхінолонів також спостерігається концентраційнозалежне зростання ензиматичної активності аргінази, з виходом на плато при 150 мМ концентрації *L*-аргініну (рис. 4.2.).

У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій *L*-аргініну активність аргінази при дії фторхінолонів була підвищена у порівнянні з такою величиною в контрольній групі. Активність зростала в ряді контроль → ципрофлоксацин → левофлоксацин → моксифлоксацин.

Ці дані прямо корелюють з поколіннями фторхінолонів. Ципрофлоксацин належить до II покоління, левофлоксацин – до III покоління. Найвища активність спостерігається при дії моксифлоксацину, який належить до IV покоління [21, 82, 88].

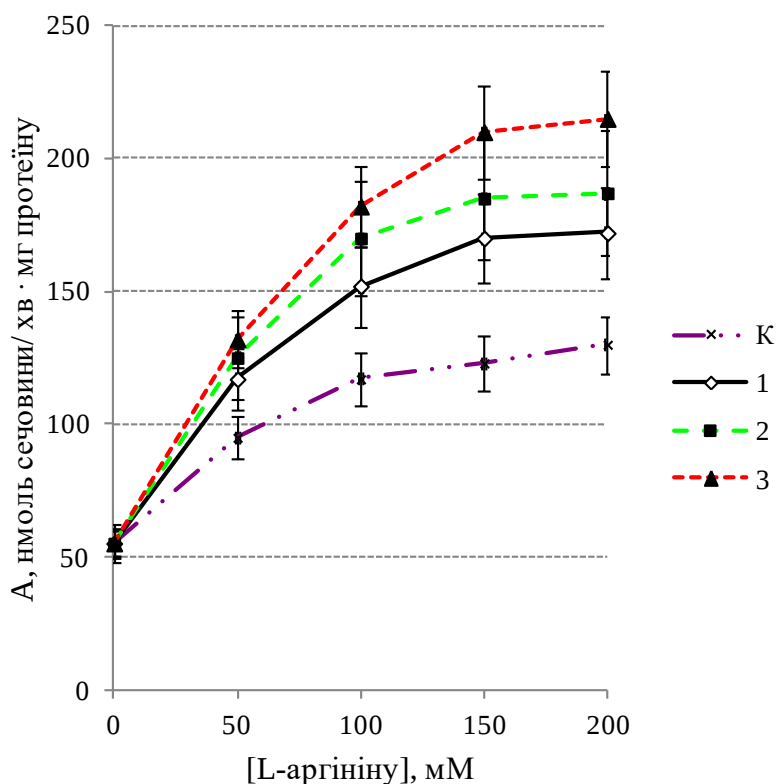


Рис. 4.2. Залежність активності аргінази лімфоцитів крові від концентрації субстрату в інкубаційному середовищі та впливу фторхінолонів (10^{-4} M). К – контроль, 1 -ципрофлоксацин, 2 - левофлоксацин і 3 – моксифлоксацин ($M \pm m$, $n=6$).

На основі лінеаризації отриманих даних рис. 4.3 у координатах Лайнуівера - Берка показаний змішаний тип інгібування активності ензиму та визначено основні кінетичні параметри метаболізму *L*-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові групи контролю та при дії фторхінолонів (табл. 4.1).

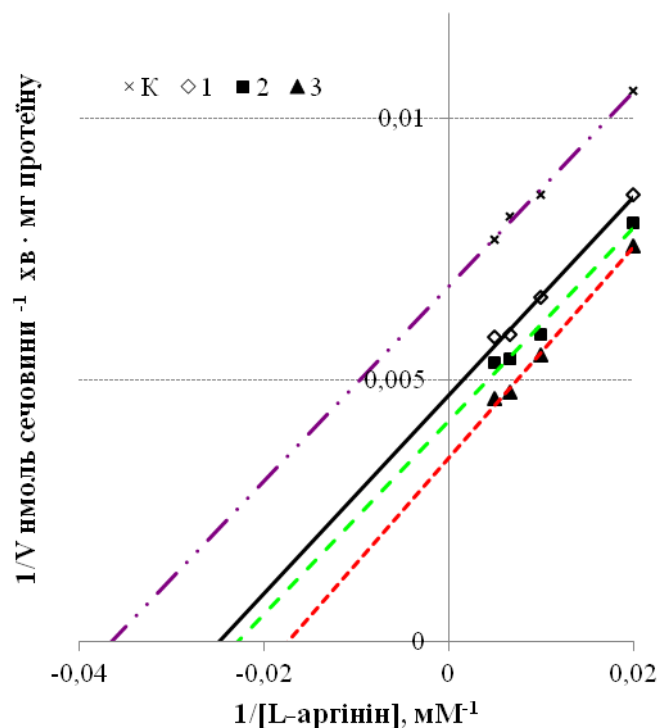


Рис. 4.3. Лінеаризація концентраційнозалежних кривих активності аргінази лімфоцитів крові від концентрації субстрату в інкубаційному середовищі та впливу фторхінолонів (10^{-4} М) в координатах Лайнуівера-Берка. К – контроль, 1 - ципрофлоксацин, 2 - левофлоксацин і 3 – моксифлоксацин. ($M \pm m$, $n=6$).

Таблиця 4.1

Кінетичні параметри, що характеризують гідроліз *L*-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові практично здорових осіб і при дії фторхінолонів у залежності від концентрації *L*-аргініну ($M \pm m$, $n = 6$)

	Контроль	Антибіотики		
		Ципрофлоксацин (10^{-4} М)	Левофлоксацин (10^{-4} М)	Моксифлоксацин (10^{-4} М)
V_{max} , нмоль сечовини / хв · мг протеїну	$147,1 \pm 12,2$	$212,8 \pm 19,3 *$	$238,1 \pm 20,4 *$	$285,2 \pm 23,2 **$
K_{L-arg} , мМ	$27,3 \pm 2,1$	$40,2 \pm 3,7 *$	$43,9 \pm 3,8 *$	$57,5 \pm 4,2 **$

Примітка: V_{max} – початкова максимальна активність аргінази, K_{L-arg} – константа Міхаеліса (спорідненості) за *L*-аргініном. Зміни вірогідні стосовно величин групи контролю, $*p<0,05$, $**p<0,001$.

Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість (V_{max}) метаболізму *L*-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові при дії ципрофлоксацину у 1,4 ($p<0,05$), левофлоксацину в 1,6 ($p<0,05$), а моксифлоксацину в 1,9 ($p<0,001$) рази вищі щодо контрольних значень. Константа спорідненості до *L*-аргініну (K_{L-arg}) у лімфоцитах крові при цьому зростає, при дії ципрофлоксацину у 1,5 ($p<0,05$), левофлоксацину в 1,6 ($p<0,05$), а моксифлоксацину в 2,1 ($p<0,001$) рази щодо групи контролю. Отже, при інтерпретації отриманих даних, визначених за *L*-аргініном, можна дійти висновку, що зростання активності аргінази в лімфоцитах при дії фторхінолонів відбувається за рахунок зростання числа обертів ензиму (V_{max} зростає), хоча спорідненість субстрату до ензиму знижується (K_{L-arg} – зростає).

Показано, що аргіназна активність лімфоцитів крові практично здорових осіб (фізіологічна норма) при оптимальних концентраціях аргініну (150 мМ) та за відсутності фторхінолонів становить ($124,2 \pm 8,8$ нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну (рис. 4.4).

При дії антибіотиків фторхінолонового ряду на лімфоцити крові в концентраціях із 10^{-5} до 10^{-2} М ця активність дозозалежно зростає. При концентрації досліджуваних фторхінолонів 10^{-4} М це зростання для ципрофлоксацину в 2,3 рази ($p<0,001$), для левофлоксацину в 2,6 рази ($p<0,001$), а для моксифлоксацину в 3,1 рази ($p<0,001$).

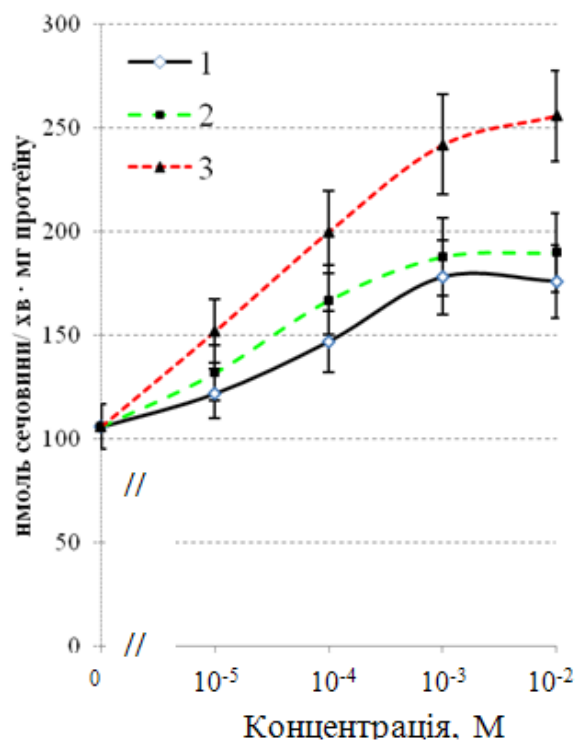


Рис. 4.4. Вплив концентрації фторхінолонів різних поколінь: ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3) на активність аргінази лімфоцитів периферичної крові ($M \pm m$, $n=6$).

Примітка: зміни вірогідні при дії концентрацій антибіотиків 10^{-4} - 10^{-2} М щодо величин групи контролю, $p < 0,001$.

Таким чином, отримані результати доводять, що при дії фторхінолонів суттєво зростає аргіназна активність лімфоцитів периферичної крові, що перш за все обумовлено зростанням максимальної швидкості реакції.

Оскільки аргіназа є Mn^{2+} -залежним ензимом, зміни концентрації йонів Mn^{2+} в середовищі інкубації, вірогідно, впливають на швидкість аргіназної реакції. Для визначення залежності активності аргінази йони Mn^{2+} додавали в середовище інкубації у різних концентраціях (за постійної концентрації *L*-аргініну – 150 мМ) (рис. 4.5).

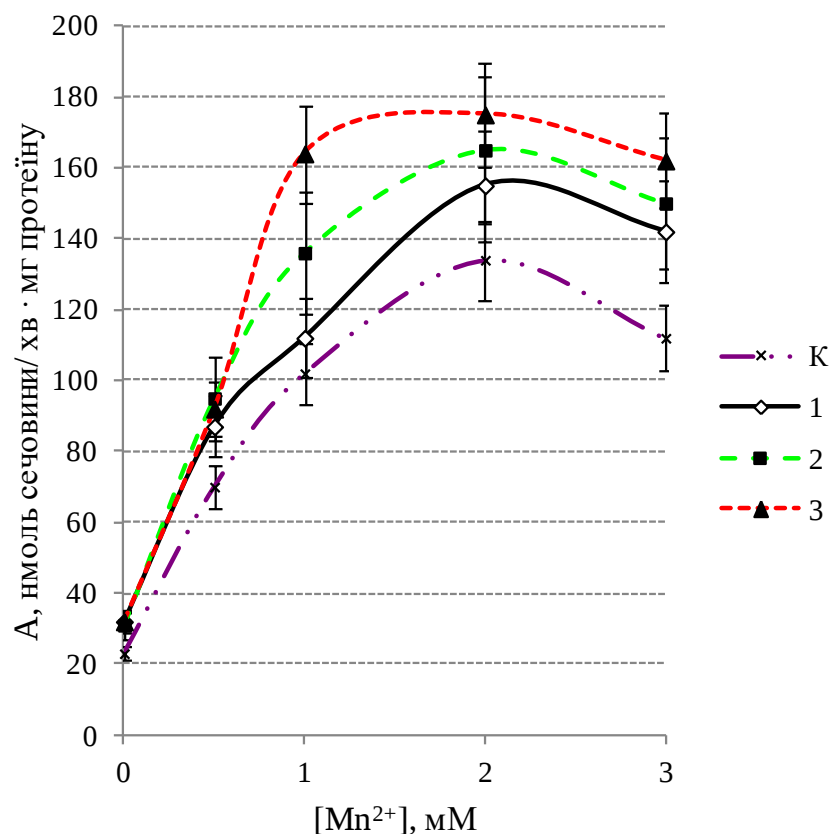


Рис. 4.5. Залежність активності аргінази лімфоцитів крові від концентрації йонів Mn^{2+} в інкубаційному середовищі та впливу фторхінолонів ($10^{-4}M$). К – контроль, 1 -ципрофлоксацин, 2 - левофлоксацин і 3 – моксифлоксацин ($M \pm m$, $n=6$).

Як видно з рис. 4.5. крива, яка відображає залежність активності аргінази лімфоцитів крові від вмісту йонів Mn^{2+} в інкубаційному середовищі має типовий куполоподібний вигляд. Зростання концентрації йонів Mn^{2+} в інкубаційному середовищі призводить до зростання аргіназної активності лімфоцитів крові, причому максимальна активність ензиму відмічається за 2 мМ $MnCl_2$ у середовищі інкубації. Схожа залежність відмічається і за присутності в інкубаційному середовищі фторхінолонів різних поколінь.

Для з'ясування можливого механізму змін активності аргінази у лімфоцитах периферичної крові концентраційні залежності були лінеаризовані в координатах Лайнуівера-Берка (рис. 4.6) та визначено основні кінетичні параметри гідролізу *L*-аргініну.

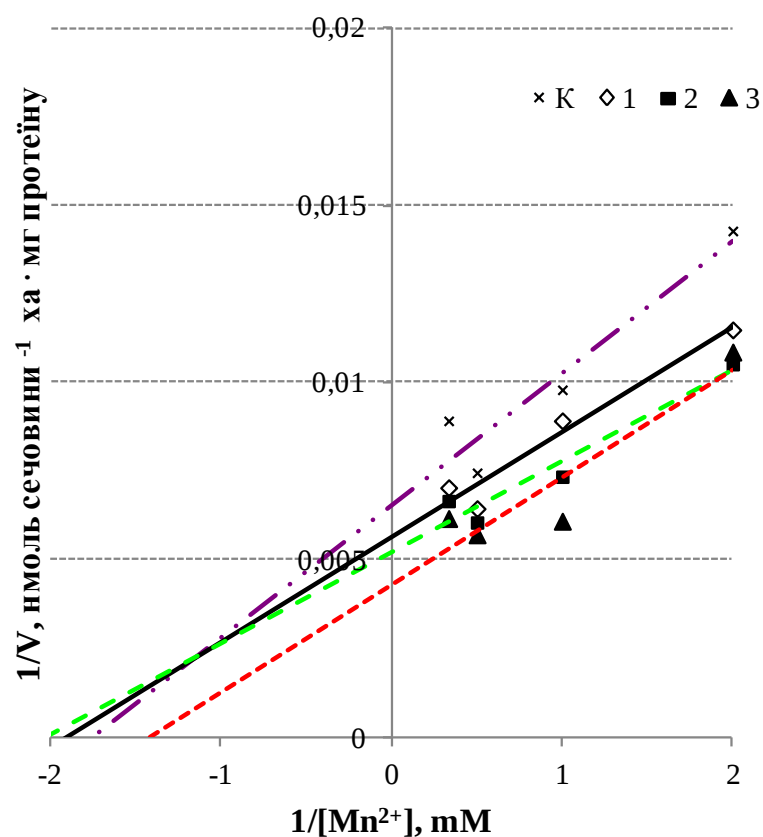


Рис. 4.6. Лінеаризація концентраційнозалежних кривих активності аргінази лімфоцитів крові від концентрації йонів Mn^{2+} в інкубаційному середовищі та впливу фторхінолонів ($10^{-4} M$) в координатах Лайнуівера-Берка.

Примітка: К – контроль, 1 - ципрофлоксацин, 2 - левофлоксацин і 3 – моксифлоксацин. ($M \pm m$, $n=6$).

Основні кінетичні параметри аргінази лімфоцитів крові від концентрації йонів Mn^{2+} в інкубаційному середовищі та впливу фторхінолонів представлені в табл. 4.2. Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість (V_{max}) гідролізу *L*-аргініну лімфоцитами крові при дії ципрофлоксацину у 1,17 ($p>0,05$), левофлоксацину в 1,25 ($p>0,05$), а моксифлоксацину в 1,5 ($p>0,05$) раза вищі щодо контрольних значень. При цьому, константа спорідненості до йонів Mn^{2+} у лімфоцитах крові вірогідно не відрізняється щодо величин у групи контролю.

Таблиця 4.2

Кінетичні параметри аргінази лімфоцитів крові, визначені за Mn^{2+} ,

$$M \pm m, n = 6$$

	Контроль	Антибіотики		
		Ципрофлоксацин (10^{-4} М)	Левовфлоксацин (10^{-4} М)	Моксифлоксацин (10^{-4} М)
V_{max} , нмоль сечовини / хв · мг протеїну	153,8±10,2	178,6±15,4	192,3±12,4 *	232,6±18,2 *
$K_{Mn^{2+}}$, мМ	0,57±0,08	0,53±0,07	0,5±0,06	0,7±0,08

Примітка: $V_{Mn^{2+}}$ – початкова максимальна активність аргінази, визначена за Mn^{2+} , K_{L-ape} – константа спорідненості до йонів Mn^{2+}

Зміни вірогідні стосовно величин групи контролю, * $p < 0,05$.

При інтерпретації отриманих даних, визначених за Mn^{2+} , можна дійти висновку, що зростання активності аргінази в лімфоцитах при дії фторхінолонів відбувається за рахунок зростання числа обертів ензиму (V_{max} зростає), без зміни спорідненості ензиму до йонів Mn^{2+} . Отже, на основі цих даних ми припускаємо, що при дії фторхінолонів Mn^{2+} -зв'язувальна ділянка аргінази лімфоцитів крові залишається нативною.

Оскільки *L*-аргінін є субстратом не тільки для аргінази, але й для всіх ізоформ NO-синтази, наступним етапом роботи було вивчення активності окремих ізоформ NO-синтази та їх кінетичних особливостей при дії декаметоксину та фторхінолонів.

4.2. Активність конститутивної та індукцйбельної ізоформ NO-синтази на лімфоцити крові за дії декаметоксину та фторхінолонів

Згідно даних літератури, в лімфоцитах крові ідентифіковано всі ізоформи NOS [112, 128, 157]. nNOS (так званий тип 1); iNOS (також відома як тип 2), яка, на відміну від nNOS і eNOS, не експресується постійно (конститутивно); синтез цього ензиму відбувається тільки при патологічних станах і може бути

індукований в клітинах різних типів при дії запальних стимулів [57, 98, 157]. eNOS (також відома як тип 3), вперше ідентифікована в клітинах ендотелію кровоносних судин.

Активність конститутивної ізоформи NO-синтази в контролі складала ($71,4 \pm 6,9$), а активність індукцйбельної ізоформи ($1,58 \pm 0,18$) нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну (рис. 4.7). За дії декаметоксину в концентрації 10^{-5} М активність cNOS знижувалась в 1,25 раза ($p < 0,05$), а активність iNOS зростала в 10,8 раза ($p < 0,001$) щодо контрольних значень.

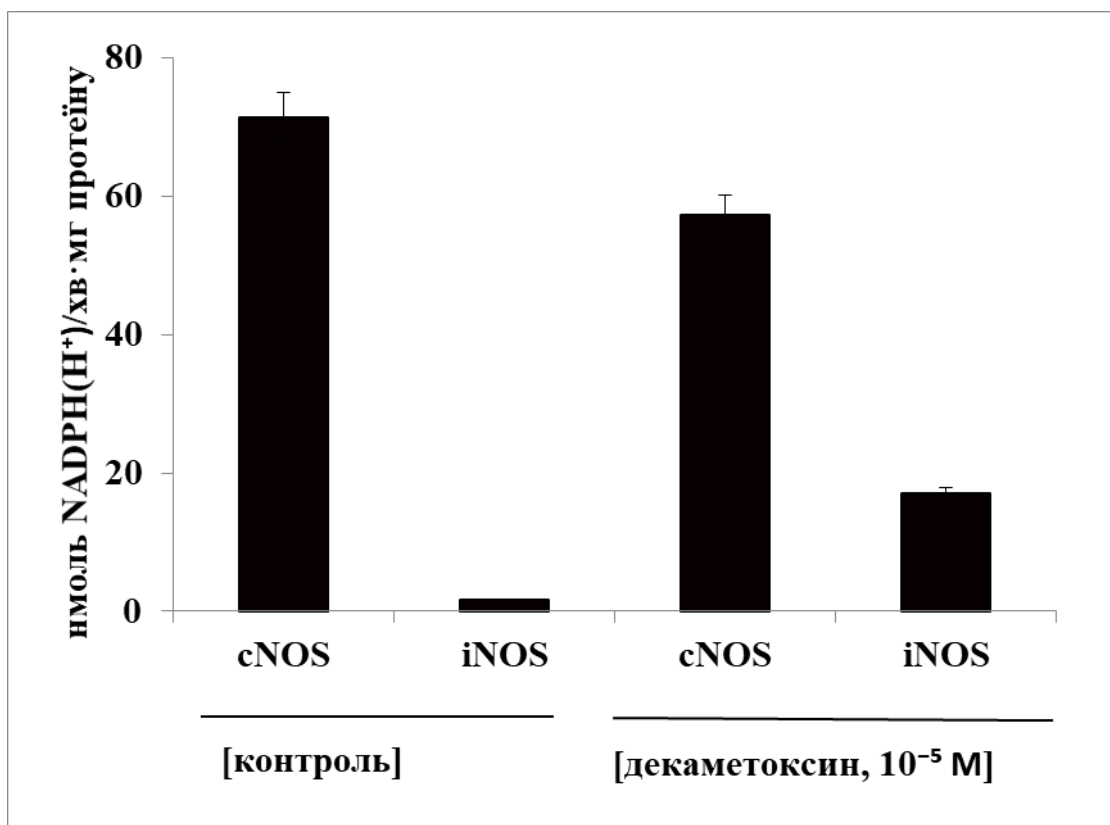


Рис. 4.7. Активність конститутивної та індукцйбельної ізоформ NO-синтази за дії декаметоксину ($M \pm m$, $n=6$).

Таким чином, показано, що антисептик декаметоксин суттєво впливає на регуляторні механізми клітини, зокрема лімфоцити крові. Стимулює активність аргінази та інгібує активність cNOS із одночасною активацією iNOS.

В результаті проведених досліджень щодо впливу фторхінолонів на активність окремих ізоформ NO-синтази встановлено, що активність cNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок становить ($71,4 \pm 6,9$) нмоль

NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну (рис. 4.8). Аналіз літературних даних свідчить про значну варіабельність абсолютних значень ензиматичної активності NOS лімфоцитів крові, що, ймовірно, обумовлено різноманітними методологічними підходами до вивчення активності ензиму.

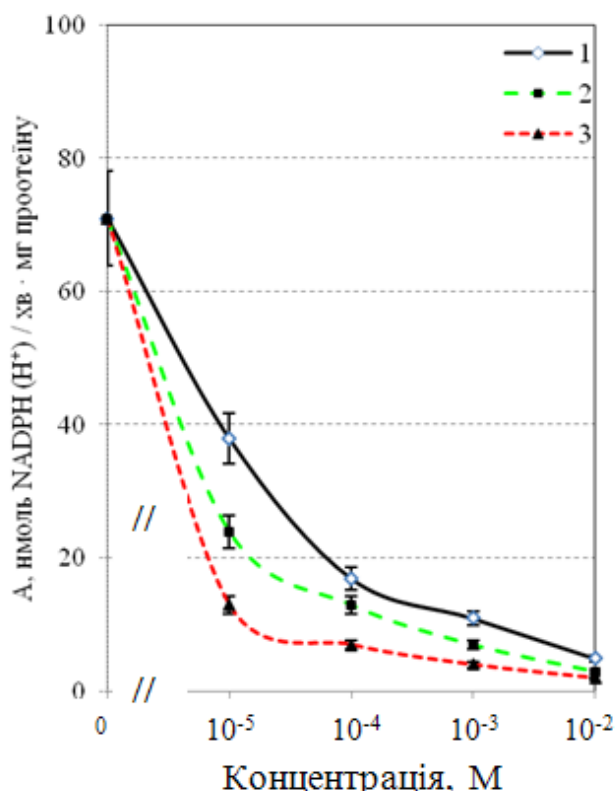


Рис. 4.8. Вплив концентрації антибіотиків різних поколінь: : ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3) на активність cNOS лімфоцитів периферичної крові ($M \pm m$, $n=6$).

Примітка: зміни вірогідні при дії концентрацій антибіотиків 10^{-5} - 10^{-2} М щодо величин групи контролю, $p < 0,001$.

В лімфоцитах крові при дії досліджуваних фторхінолонів у концентрації 10^{-4} М, моксифлоксацин зумовлює зниження активності cNOS в 10,2 раза ($p < 0,001$), левофлоксацин – у 5,5 раза ($p < 0,001$) та левофлоксацин – у 4,2 раза ($p < 0,001$) щодо групи контролю ($p < 0,001$).

Відомо, що cNOS продукує низькі концентрації NO, в той час як iNOS синтезує високі концентрації NO (> 300 нМ) [113, 121]. iNOS є кальцій-

незалежною ізоформою NOS і, на відміну від cNOS, не експресується постійно (конститутивно).

Встановлено, що активність iNOS лімфоцитів крові клінічно здорових осіб ідентифікується в незначній мірі, практично на межі похибки, та становить $(1,58 \pm 0,18)$ нмоль $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$ на 1мг протеїну (рис. 4.9).

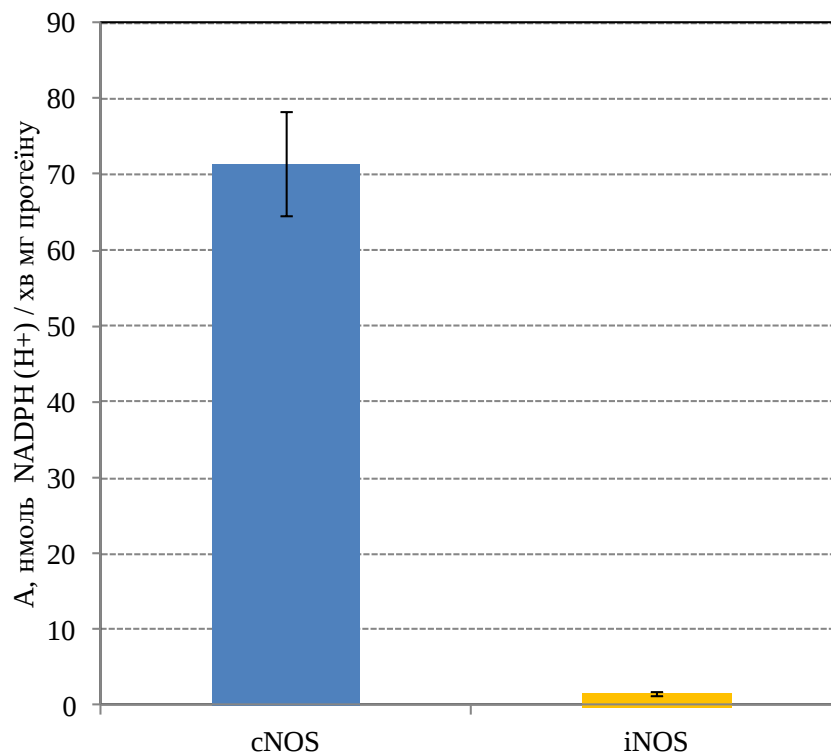


Рис. 4.9. Порівняльні величини конститутивної та індукцйбельної ізоформи NO-синтази в лімфоцитах крові за фізіологічної норми ($M \pm m$, $n=6$).

При вивченні впливу фторхінолонів на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових жінок, її активації ми не спостерігали, а інгібуючий ефект неможливо було визначити через низьку активність. Для індукування активності iNOS в лімфоцитах крові використовували оксидативний стрес, преінкубуючи лімоцити з H_2O_2 . Преінкубація лімфоцитів із 0,2 мМ H_2O_2 призводить до зростання активності iNOS в 31,3 раза, з $(1,58 \pm 0,18)$ до $(34,3 \pm 0,18)$ нмоль $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$ на 1мг протеїну (рис. 4.10). На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, ципрофлоксин призводить до

інгібування активності ензиму в 1,2 раза ($p < 0,05$), левофлоксацин – у 1,4 ($p < 0,05$), а моксифлоксацин – у 2,3 раза ($p < 0,001$).

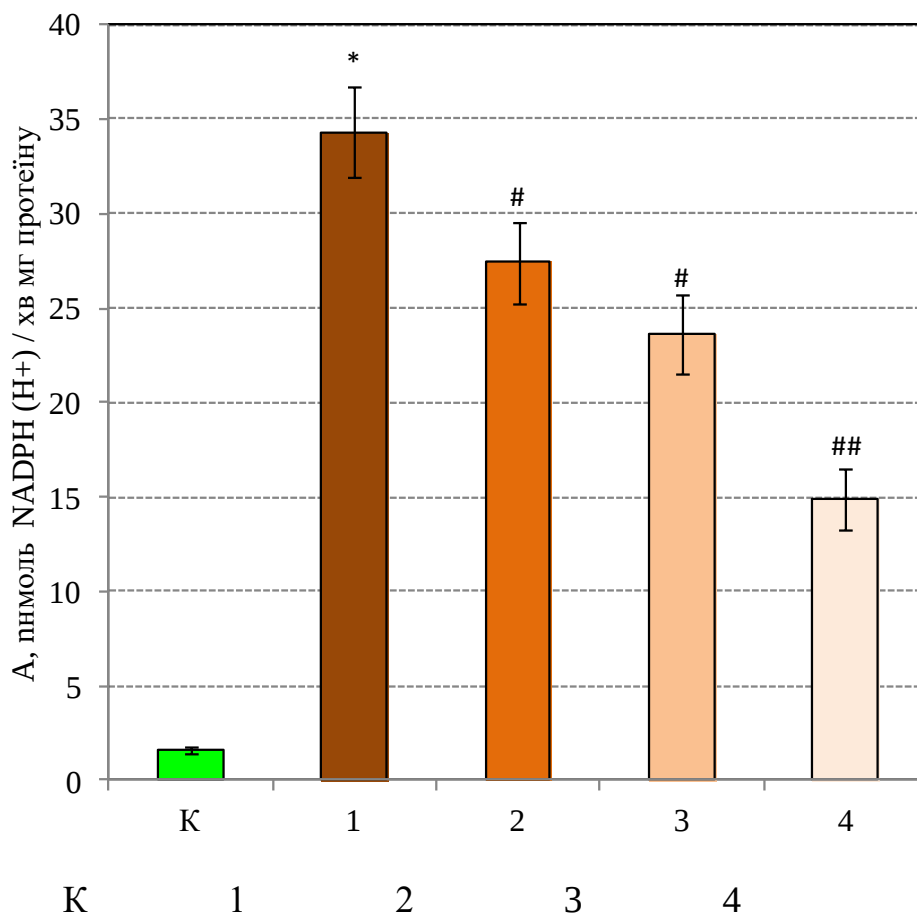


Рис. 4.10. Вплив фторхінолонів (10^{-5} M) на активність індукцйбельної ізоформи NO-синтази в лімфоцитах крові за умов H_2O_2 -індукованого стресу ($M \pm m$, $n=6$).

Примітка: К – контроль; 1 – у присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі; 2 – H_2O_2 + ципрофлоксацин; 3 – H_2O_2 + левофлоксацин; 4 – H_2O_2 + моксифлоксацин;

* $p < 0,001$ відносно активності iNOS у контролі, # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ відносно активності iNOS за відсутності фторхінолонів в інкубаційному середовищі.

Ці дані корелюють з поколіннями антибіотиків.

Слід відмітити, що подібні результати щодо інгібування фторхінолонами iNOS отримані і на інших об'єктах. Так, показано, що моксифлоксацин інгібує iNOS в епітеліальних клітинах дихальних шляхів людини [25, 150]. Стимуляція клітин цитокінами призводить до зростання рівня NO в 3.3 раза, а моксифлоксацин пригнічує це зростання на 68 %. Також

зростання активності iNOS інгібувалось попереднім додаванням до клітин моксифлоксацину на 62 %.

Подібні результати щодо інгібування iNOS ципрофлоксацином отримані і in vivo при лікуванні резистентної до ліків стрептококової пневмонії [25, 150]. Показано, що терапія цим препаратом призводить до значного зниження NO через 8 год після антибактеріотерапії, яке спостерігалось до кінця 24 год. Інші модифіковані фторхінолони теж призводять до селективного інгібування iNOS [218].

Щодо мікробіологічної характеристики, то ципрофлоксацин (II покоління) є «золотим стандартом» серед фторхінолонів. Його біодоступність 80 %. Діє переважно на грамнегативну флору та на деякі грампозитивні мікроорганізми. Важливе значення має його активність щодо кишкової палички, сальмонел, шигел. Із грампозитивних мікроорганізмів найбільш чутливі стафілококки, мікобактерії туберкульозу. Помірну активність проявляє щодо пневмококів, ентерококів, хламідій.

Левовфлоксацин (III покоління) має переваги над іншими фторхінолонами щодо активності по відношенні до пневмококів, мікоплазм, хламідій. Біодоступність його, при пероральному введенні, складає 100 %. Окрім респіраторних інфекцій він використовується для лікування інфекцій сечостатевої системи, шкіри, м'яких тканин.

Моксифлоксацин (IV покоління) проявляє значно вищу активність щодо грампозитивних мікроорганізмів у порівнянні з попередніми фторхінолонами. Він високоактивний щодо стрептококів, стафілококів і в меншій мірі – ентерококів. Активність моксифлоксацину щодо пневмококів у 4-16 разів вища ніж у ципрофлоксацину. Препарат є ефективним щодо грампозитивних бактерій, стійких до багатьох інших антибіотиків. Він володіє також високою активністю стосовно грамнегативних бактерій, зокрема ентеробактерій, нітробактерій, гонококів. Моксифлоксацин також діє на хламідії, мікоплазми, уреаплазми, мікобактерії туберкульозу, найпростіші [220]. Однак, поступається левофлоксацину за дією на синегнійну паличку. Біодоступність

цього препарату, при пероральному введенні, становить 90 %. В цілому, дані літератури свідчать, що моксифлоксацин серед інших фторхінолонів є найбільш ефективним, безпечним антибактеріальним препаратом, зокрема щодо лікування інфекцій органів дихання. Він володіє широким спектром антимікробної активності, дуже позитивними фармакокінетичними властивостями, високою клінічною ефективністю при інфекціях верхніх і нижніх дихальних шляхів і доброю переносимістю.

Таким чином, в той час, як антимікробні властивості фторхінолонів вивчені досить добре, їх паралельна дія на біохімічні процеси та регуляторні механізми клітин макроорганізму практично не досліджена.

Отримані нами результати, щодо дії фторхінолонів, вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що призводить до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів, зокрема регуляторної функції NO. Зниження індукованої H_2O_2 активності iNOS за дії фторхінолонів свідчить про те, що ці антибіотики можуть запобігати гіперпродукції NO в лімфоцитах крові. Відомо, що NO, що продукується у надмірній кількості при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриту – продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини [113, 140, 211]. Ймовірно, що одним із механізмів дії фторхінолонів є зниження гіперпродукування NO.

За фізіологічних умов, аргіназа регулює концентрацію *L*-аргініну в клітині та інгібує активність NOS шляхом конкурування за спільний субстрат, і, таким чином, безпосередньо регулює синтез NO [116, 137, 163].

L-аргінін є єдиним субстратом для синтезу NO всіма формами NOS. Доступність внутрішньоклітинного *L*-аргініну є лімітуючим фактором NO-синтезу і потенційним механізмом контролю регуляторної функції NO, оскільки більшість типів клітин не здатні синтезувати *L*-аргінін і потребують його екзогенного надходження. *L*-аргінін виступає ключовою молекулою у низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які

зазнають серйозних змін під час різних патологічних станів [116, 128, 132, 134, 143, 150, 216].

Таким чином, зростання активності аргінази лімфоцитів крові, при дії фторхінолонів, свідчить про загальну потребу клітин в *L*-аргініні.

Отримані нами результати, щодо дії фторхінолонів, вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що ведуть до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів, зокрема регуляторної функції NO. Відомо, що NO, що продукується у надмірній кількості, при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриту – продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини [29]. Судячи з отриманих нами результатів, фторхінолони здатні знижувати високі цитотоксичні концентрації NO в клітинах при патологічних станах і, таким чином, спричиняти позитивний лікувальний ефект.

За фізіологічних умов, аргіназа регулює концентрацію *L*-аргініну в клітині та інгібує активність NOS шляхом конкурування за спільний субстрат, і, таким чином, безпосередньо регулює синтез NO [167-171].

L-аргінін є єдиним субстратом для синтезу NO всіма формами NOS. Доступність внутрішньоклітинного *L*-аргініну є лімітуючим фактором NO-синтезу і потенційним механізмом контролю регуляторної функції NO, оскільки більшість типів клітин не здатні синтезувати *L*-аргінін і потребують його екзогенного надходження. *L*-аргінін виступає ключовою молекулою у низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які зазнають серйозних змін під час різних патологічних станів [158, 164-166].

Зміни активностей аргіназної та NOS ензиматичних систем лише вказують на спрямованість дисметаболічних порушень в системі NO-гомеостазу. Проте, біохімічні механізми, що ведуть до змін функціональної активності досліджуваних ензиматичних систем при дії фторхінолонів залишаються не з'ясованими. Тому, наступний етап нашого дослідження був

присвячений вивченню кінетичних властивостей cNOS та iNOS ізоформ лімфоцитів крові.

З метою вивчення особливостей і механізму роботи NOS, визначали максимальну миттєву швидкість реакції (V_0), максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції (P_{max}) та характеристичний час реакції (τ). Для встановлення цих кінетичних параметрів NOS, досліджували динаміку зменшення NADPH(H^+), що свідчить про синтез NO. Для цього суспензію лімфоцитів інкубували в стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (0-30 хв).

Результати досліджень показали, що кінетичні криві утворення NO у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові мають тенденцію до насичення (рис. 4.11). З цього рис. видно, що кінетика утворення NO, за участю cNOS узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0 – 20 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності утворення NO від періоду інкубації є практично лінійним. Тому у подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і, відповідно, NO-синтазної реакції становила 20 хв.

Як видно з рис. 4.11, динаміка і кількість утворення NO за участю cNOS лімфоцитів крові при дії фторхінолонів є суттєво нижчими ніж в групі контролю.

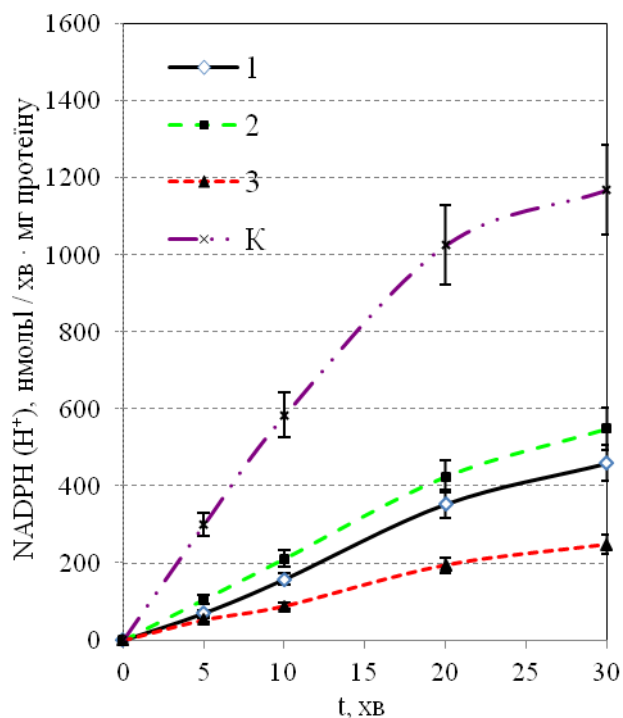


Рис. 4.11. Динаміка споживання NADPH(H⁺) у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові при дії фторхінолонів ($M \pm m$, $n = 6$).

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах P/t від P обчислено основні кінетичні характеристики NOS реакції лімфоцитів крові (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

Кінетичні параметри конститутивної NO-синтазної реакції лімфоцитів крові при дії фторхінолонів ($M \pm m$, $n = 6$)

Групи Показники	Контроль	Ципро- флоксацин (10 ⁻⁵ M)	Левो- флоксацин (10 ⁻⁵ M)	Мокси- флоксацин (10 ⁻⁵ M)
V_0 , nmol NADPH(H ⁺)/min·mg protein	92,2±7,1	28,8±2,9	27,4±3,1	18,8±1,3
P_{max} , nmol NADPH(H ⁺)/mg protein	3408±285	961,2±85,3	944,3±87,4	883,5±77,4
τ , min	36,1±4,0	41,6±4,2	43,7±4,1	50,2±4,3

Значення кінетичних параметрів для cNOS лімфоцитів крові контрольної групи та при дії фторхінолонів істотно відрізняються між собою. Так, V_0 в контрольній групі складало $(92,2 \pm 7,1)$ нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну. При дії ципрофлоксацину V_0 суттєво знижувалось, у 3,2 раза ($p < 0,001$), при дії левофлоксацину – у 3,4 раза ($p < 0,001$), а при дії моксифлоксацину – у 4,9 раза ($p < 0,001$).

Щодо кінетичних параметрів індукцйбельної NO-синтазної реакції, то із-за її низької активності в контролі, коректно розрахувати їх не було можливим.

Синтез NO за участю cNOS при дії фторхінолонів відбувається повільніше і менш активно, ніж за їх відсутності. Щодо максимальної кількості утвореного продукту реакції, продукowanego в cNO-синтазній реакції, то при дії ципрофлоксацину, то його утворювалось в 3,5 менше, ніж у контрольній групі ($p < 0,001$). При дії левофлоксацину – у 3,6 раза менше, а при дії моксифлоксацину – у 3,8 раза менше щодо групи контролю.

При аналізі характеристичного часу реакції було з'ясовано, що він зростав із $(36,1 \pm 4,0)$ хв (контроль) до $(50,2 \pm 4,3)$ хв ($p < 0,05$).

Оскільки, *L*-аргінін є субстратом для cNOS, його біодоступність може впливати на активність ензиму. Відомо, що *L*-аргінін відіграє ключову роль у регуляції каталітичної активності ензиму, сприяє димеризації його ізоформ. Відтак, зміни концентрації *L*-аргініну в інкубаційному середовищі впливають, вірогідно, на швидкість cNO-синтазної реакції. Показано, що зростання концентрації *L*-аргініну в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 0,01 до 0,2 мМ (за сталої концентрації $CaCl_2$ – 10 мМ та NADPH – 0,12 мМ) призводить до поступового зростання ензиматичної активності cNOS з виходом на плато (рис. 4.12). При цьому, максимальна активність cNOS лімфоцитів крові відмічається за наявності 0,15 мМ *L*-аргініну в інкубаційному середовищі. Схожа концентраційна залежність прослідковується і за наявності фторхінолонів в інкубаційному середовищі.

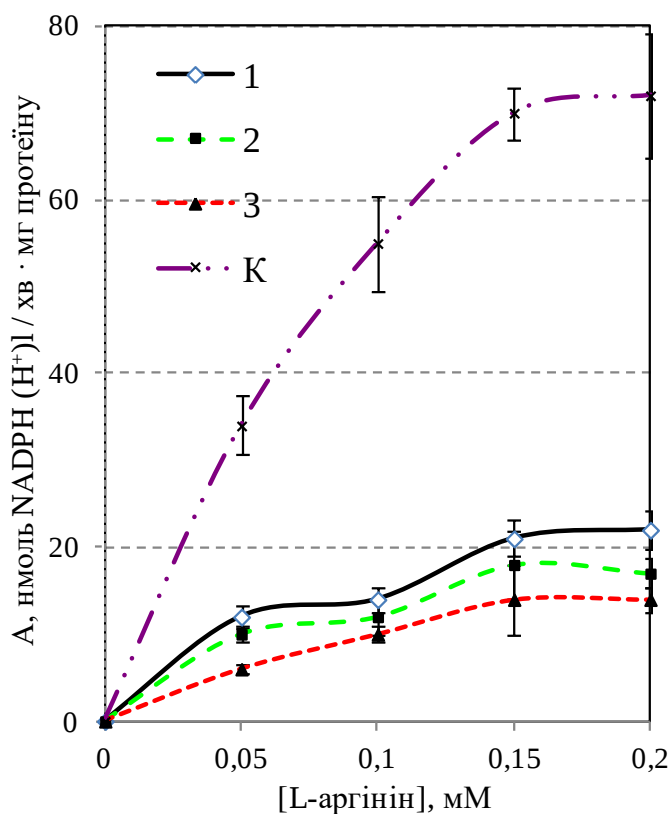


Рис. 4.12. Концентраційна залежність впливу *L*-аргініну на активність cNOS лімфоцитів крові при дії фторхінолонів ($M \pm m$, $n = 6$)

Подальше зростання концентрації *L*-аргініну в середовищі інкубації не призводить до зростання ензиматичної активності cNOS. Проте, у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій субстрату, активність cNOS лімфоцитів крові, за наявності фторхінолонів, була вірогідно знижена порівняно з її величиною у контролі.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у зворотних координатах Лайнуївера - Берка визначено основні кінетичні параметри реакції каталізованої cNOS у лімфоцитах крові (табл. 4.4).

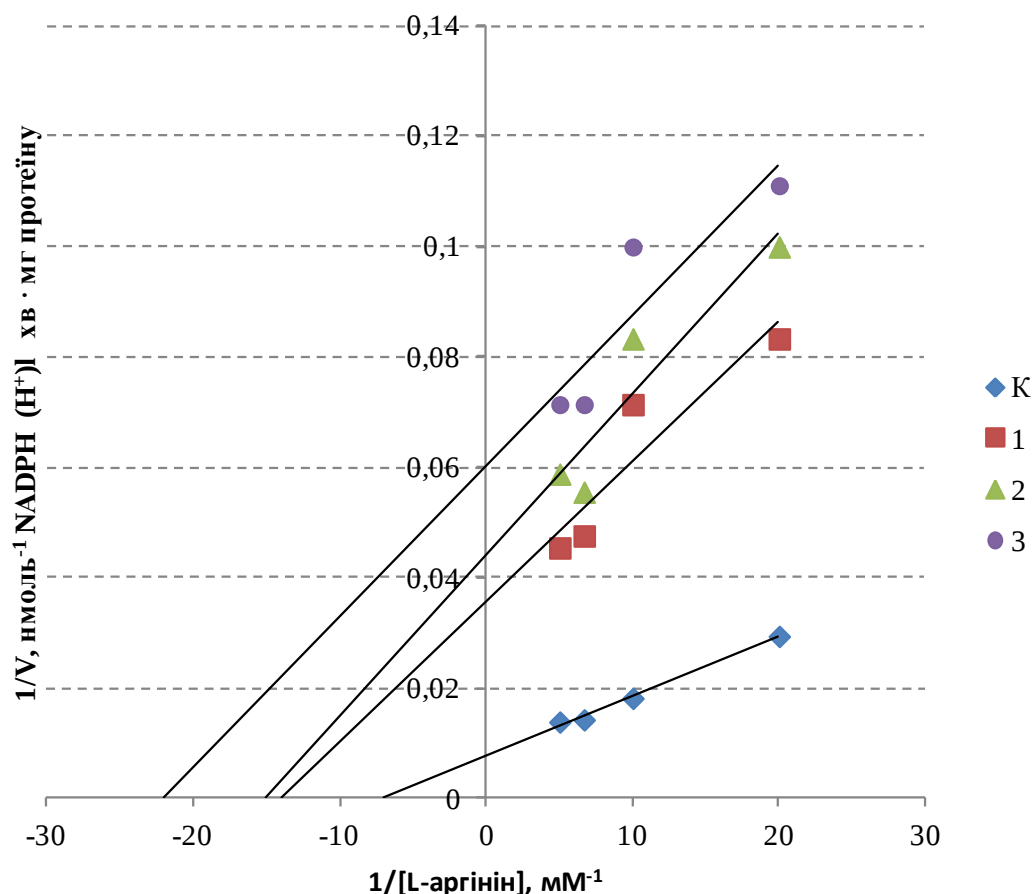


Рис. 4.13. Лінеаризація концентраційних кривих, наведена на рис. 6.4, у координатах Лайнуівера - Берка, $n = 6$; $r > 0,8$

Як видно з рис. 4.13, концентраційні криві $\{1/[S]; 1/[V]\}$ відрізняються кутом нахилу - у контролі та, за наявності фторхінолонів, в середовищі інкубації. Як впливає з даних, представлених у табл. 4.4, значення початкової максимальної активності cNOS у лімфоцитах крові за наявності ципрофлоксацину в 4,5 раза ($p < 0,001$), а за наявності левофлоксацину – у 5,6 раза ($p < 0,001$) нижче стосовно цієї величини у контролі. Найбільш виражене пригнічення початкової максимальної активності cNOS відмічається при інкубації з моксифлоксацином – у 7,7 раза ($p < 0,001$) стосовно контролю.

Кінетичні параметри cNOS лімфоцитів крові при дії фторхінолонів
($M \pm m$, $n = 6$)

Групи Показники	Контроль	Ципро- флоксацин ($10^{-5}M$)	Левो- флоксацин ($10^{-5}M$)	Мокси- флоксацин ($10^{-5}M$)
V_{max} , нмоль NADPH (H^+) / хв · мг протеїну	128,2±15,4	28,2±3,6 *	22,8±2,5 *	16,6±2,2 *
K_{L-Arg} , мкМ	0,14±0,06	0,07±0,008 *	0,06±0,01 *	0,04±0,008 *

Примітка: V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, визначена за *L*-аргініном;

K_{L-Arg} – уявна константа спорідненості до *L*-аргініну.

Зміни вірогідні стосовно величин у контролі * $p < 0,001$

Значення уявної константи афінності (спорідненості) cNOS до *L*-аргініну у лімфоцитах периферичної крові осіб групи контролю у 2 – 3,5 рази ($p < 0,01$) перевищують цей показник у лімфоцитах, преінкубованих з фторхінолонами, що вказує на зростання спорідненості ензиму до *L*-аргініну.

Отримані результати вказують, що при інкубації з фторхінолонами, пригнічення активності cNOS відбувається, головним чином, за рахунок зниження числа обертів ензиму.

Висновок. При інтерпретації отриманих кінетичних параметрів, визначених за *L*-аргініном, показано, що за дії фторхінолонів, зростання активності аргінази в лімфоцитах відбувається за рахунок зростання числа обертів ензиму (V_{max} зростає) на фоні зниження спорідненості субстрату до ензиму (K_{L-arg} зростає). Отримані кінетичні параметри свідчать, що у лімфоцитах крові, при дії фторхінолонів, інгібується синтез NO за участю cNOS та інгібується гіперпродукція NO, спричинена активацією iNOS, що характерно для патологічних станів. Отже, за умов впливу фторхінолонів на лімфоцити крові, порушується співвідношення NO-синтазного та аргіназного

метаболізму *L*-аргініну, що свідчить про дисметаболічні зміни в системі синтезу NO.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях:

1. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Vorobets NM, Melnyk OV, Vorobets ZD. Arginase/NO-synthase system characteristics in blood lymphocytes under effect fluoroquinolones. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019;10(2):203-8 (Web of Science).
2. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Fafula RV, Vorobets ZD. Fluoroquinolones influence on the L-arginine/NO system activity in blood lymphocytes. *Slovak International Scientific Journal*. 2020;1(39):3-5.
3. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Fafula RV, Melnyk OV, Vorobets ZD. Characteristics of antioxidant and NO-synthase systems of blood lymphocytes under the action of decamethoxine // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2020; 1(88): 15-22.
4. Коваленко ІВ, Воробець ЗД. Вплив антибіотиків фторхінолонового ряду на активність аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові. Сучасні аспекти збереження здоров'я людини. Збірник праць XIII Міжнаодної міждисциплінарної наук.-практ. конф.; 2020 квіт. 3-4; Ужгород; 2020, с. 286-91.
5. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Мельник ОВ, Корчинська ОС, Корнійчук ОП. Кінетичний аналіз активності ензимів NO-синтазної системи лімфоцитів крові за дії антибіотиків фторхінолонового ряду. *Medical and clinical chemistry*. 2019;3(80):96-7.
6. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Корнійчук ОП, Воробець ЗД. Вплив фторхінолонів на регуляторну систему аргіназа/NO-синтаза лімфоцитів крові. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. Підсумкова LXII наук.-практ. конф. присвячена 165-річчю від дня народження І.Я. Горбачевського; 2019 черв. 13; Тернопіль; 2019, с. 86-7.

7. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Корчинська ОС, Корнійчук ОП. Реакція аргіназно-NO-синтазної системи лімфоцитів крові на дію антибіотиків фторхінолонового ряду. 6-th Ukrainian congress for cell biology with international representation; 2019 черв. 18-21; Yaremche, Ukraine; 2019, с. 57.
8. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Воробець ЗД. Вплив декамтоксину на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної та антиоксидантної систем лімфоцитів крові. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю. Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження, присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету; 2020 трав. 19-20; Івано-Франківськ; 2020, с. 126-7.

РОЗДІЛ 5.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ФТОРХІНОЛОНІВ НА ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМИ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ

Згідно сучасних уявлень, вплив на організм ксенобіотиків, ліків, розвиток патологічних процесів супроводжуються порушенням механізмів антиоксидантного захисту клітин [1, 6, 103, 118, 201]. При дії хімічних препаратів часто ініціюються окиснювальні вільнорадикальні процеси в фосфоліпідах клітинних мембран, що містять поліненасичені жирні кислоти. Інтенсифікація пероксидації ліпідів призводить до накопичення токсичних продуктів, що супроводжується зниженням резистентності організму [103, 115, 118, 201]. В той же час, буферна ємність антиоксидантної системи достатньо велика та забезпечується різними складовими. Важливе місце серед АОС клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S трансфераза), так і в неензиматичних (глутатіон) реакціях АОС [142, 154]. Хоча система глутатіону є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в реакції організму на дію тих чи інших антибіотиків, чи розвиток патологічних станів. У зв'язку з тим, аналіз функціонального стану системи глутатіону, при дії антисептиків та антибіотиків фторхінолонового ряду, дозволить виявити її роль в механізмі дії даних препаратів.

5.1. Пероксидація ліпідів і система глутатіону в лімфоцитах крові за дії декаметоксину

Інтенсифікація пероксидації ліпідів призводить до накопичення токсичних продуктів, що супроводжується зниженням резистентності організму [103, 115, 118, 201]. В той же час, буферна ємність антиоксидантної системи достатньо велика та забезпечується різними складовими. Важливе

місце серед АОС клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь, як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S трансфераза), так і в неензиматичних (глутатіон) реакціях АОС [136, 142, 154]. Хоча система глутатіону є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в розвитку патологічних станів, запальних процесах, дії антисептиків та антибіотиків на організм. У зв'язку з тим, аналіз функціонального стану системи глутатіону та пероксидації ліпідів дозволить детальніше з'ясувати механізм дії антисептика декаметоксину.

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в лімфоцитах периферичної крові при дії декаметоксину.

Показано незначне інгібування процесів ПОЛ за дії різних концентрацій декаметоксину, яку оцінювали за визначенням концентрації малонового діальдегіду, який є вторинним продуктом пероксидації ліпідів (рис. 5.1).

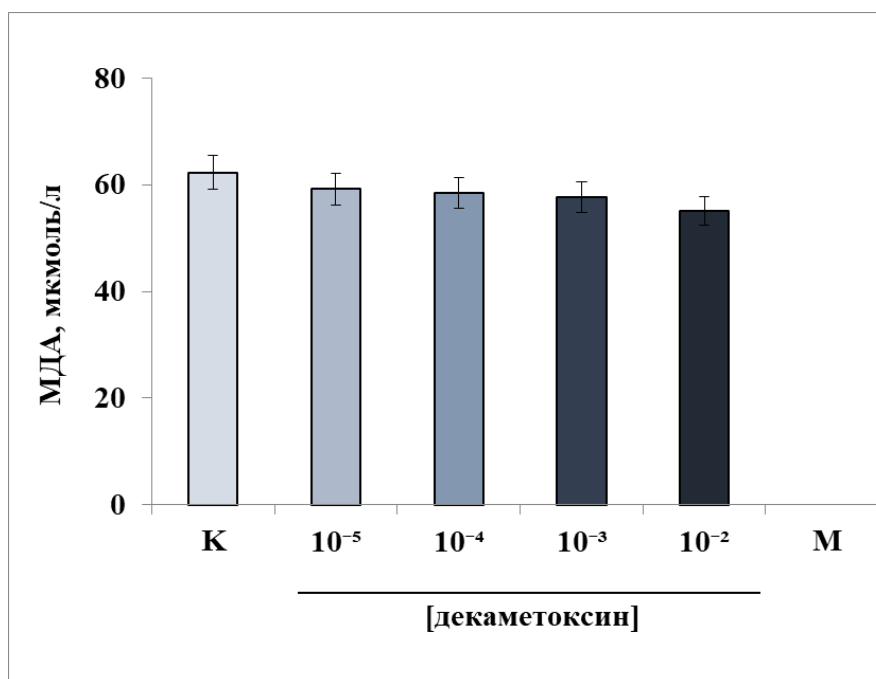


Рис. 5.1. Концентрація малонового діальдегіду у лімфоцитах крові практично здорових жінок (контроль) та при дії на лімфоцити різних концентрацій декаметоксину ($M \pm m$, $n = 6$).

Примітка: зміни невірогідні щодо величин в осіб контрольної групи, $*p > 0,001$.

Так, у контролі концентрація МДА у лімфоцитах крові складає $(62,3 \pm 4,6)$ мкмоль/мг протеїну. При дії різних концентрацій декаметоксину (10^{-5} – 10^{-2} М) ця величина дещо знижується, до $(55,1 \pm 4,3)$ мкмоль/мг протеїну ($p > 0,001$).

Таким чином, у лімфоцитах крові, достовірних змін в процесах ПОЛ при дії декаметоксину не виявлено, хоча спостерігається тенденція до їх зниження.

На відміну від декаметоксину, фторхінолони мали протилежний ефект на процеси ПОЛ. Всі досліджувані нами фторхінолони дозозалежно активували процеси ПОЛ.

Одночасно з незначним зниженням процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни в активності ензимів системи глутатіону (рис. 5.2). Так, показано, що в контролі- глутатіонпероксидазна активність лімфоцитів складає $(154,2 \pm 13,4)$ нмоль GSH/хв·мг протеїну.

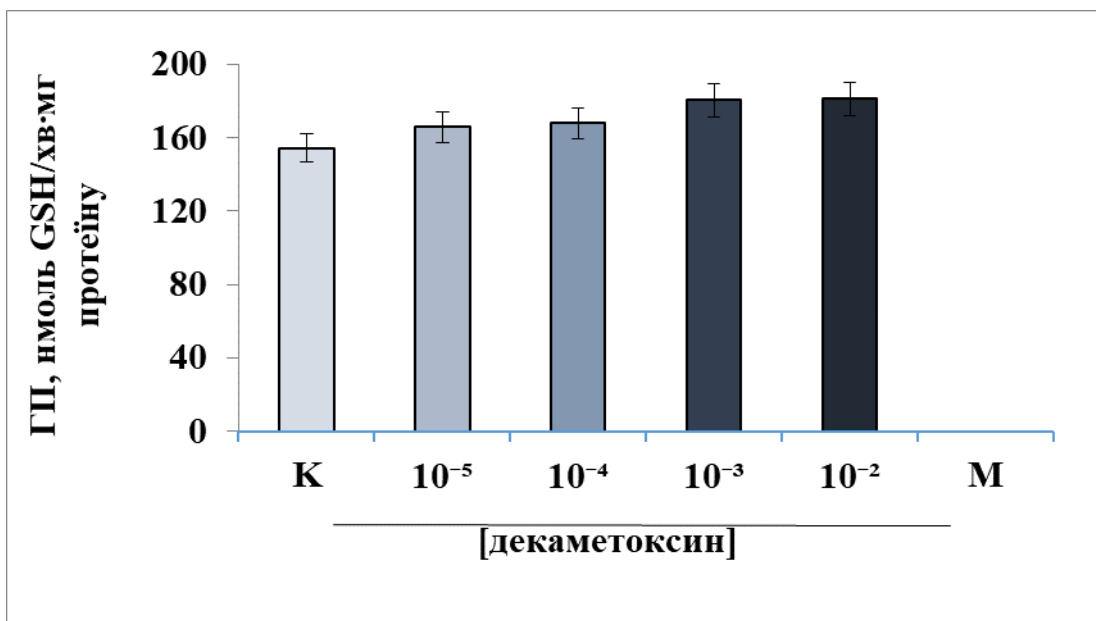


Рис. 5.2. Глутатіонпероксидазна активність лімфоцитів крові за дії різних концентрацій декаметоксину ($M \pm m$, $n = 6$).

За дії декаметоксину, ця активність дозозалежно зростає і сягає $(181,2 \pm 13,3)$ нмоль GSH/хв·мг протеїну ($p < 0,05$). Однак, концентрація відновленого глутатіону при дії декаметоксину практично не змінювалась і знаходилась в межах $(17,2$ – $18,4)$ нмоль GSH/мг протеїну. Раніше нами було

продемонстровано, що фторхінолони теж дозозалежно стимулюють глутатіонпероксидазну активність.

Щодо активності глутатіонредуктази, то в контролі вона складала $(51,7 \pm 4,2)$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну (рис. 5.3). При дії декаметоксину в концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М ця активність дозозалежно зростала до $(62,3 \pm 5,4)$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну, тобто в 1,2 раза щодо групи контролю ($p < 0,05$).

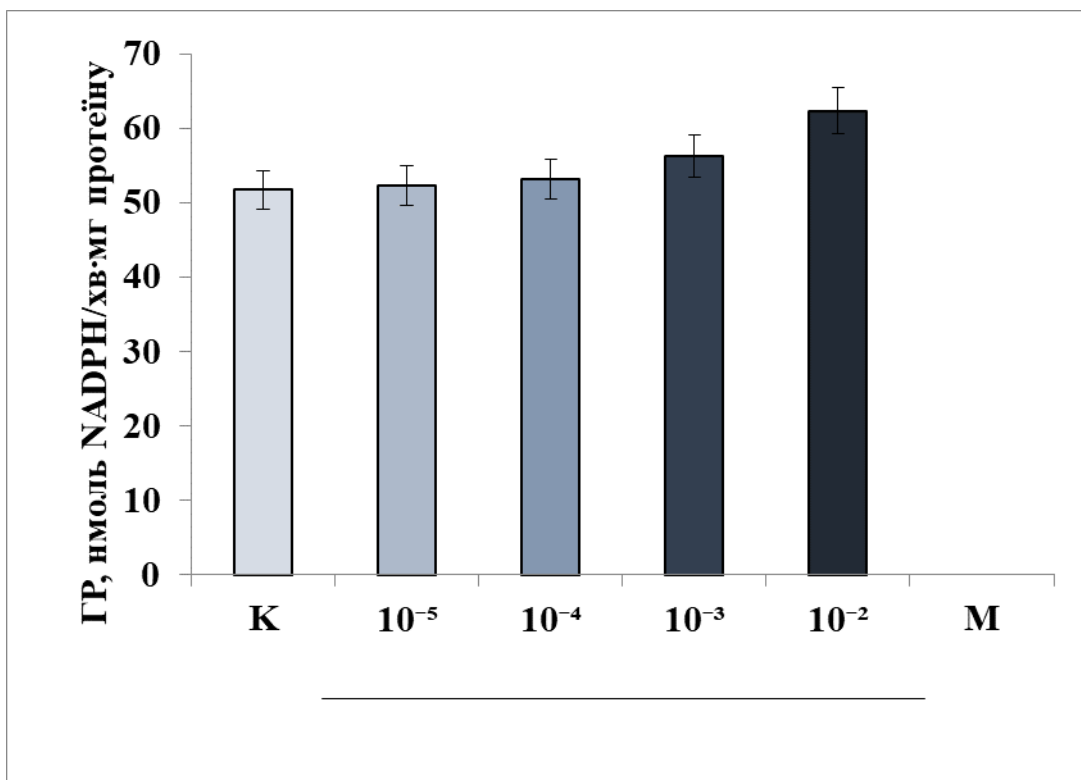


Рис. 5.3. Глутатіонредуктазна активність лімфоцитів крові за дії різних концентрацій декаметоксину ($M \pm m$, $n = 6$).

Глутатіон-S трансферазна активність в контролі складала $(120,2 \pm 9,2)$ нмоль GSH/хв·мг протеїну (рис. 5.4). Додавання в інкубаційне середовище декаметоксину в концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М дозозалежно активувало цей ензим, активність якого зростала до $(156,6 \pm 12,4)$ нмоль GSH/хв·мг протеїну, тобто в 1,4 раза ($p < 0,05$).

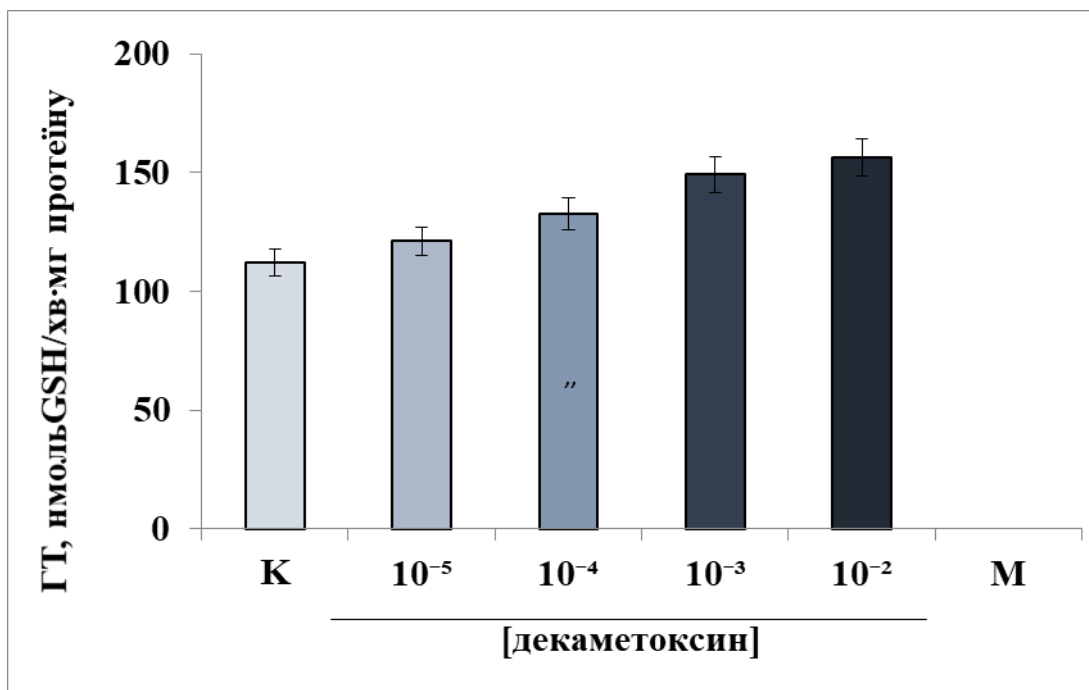


Рис. 5.4. Глутатіон-S трансферазна активність лімфоцитів крові за дії різних концентрацій декаметоксину ($M \pm m$, $n = 6$).

Висновок. Показано, що антисептик декаметоксин суттєво впливає на регуляторні механізми клітини, зокрема лімфоцити крові. Активує ензими глутатіонової антиоксидантної системи.

5.2. Пероксидація ліпідів і система глутатіону в лімфоцитах крові за дії фторхінолонів

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в лімфоцитах периферичної крові- при дії фторхінолонів II – IV поколінь. У всіх випадках, показано активацію процесів ПОЛ, за визначенням концентрації малонового діальдегіду, який є вторинним продуктом пероксидації ліпідів (рис. 5.5). Так, у сироватці крові контрольної групи, концентрація МДА дорівнює $(4,1 \pm 0,4)$ мкмоль/л. При дії ципрофлоксацину (II покоління) -процеси ПОЛ інтенсифікуються в 1,7 раза щодо показників у групі контролю, при цьому концентрація МДА сягає $(6,6 \pm 0,5)$ мкмоль/л ($p < 0,001$).

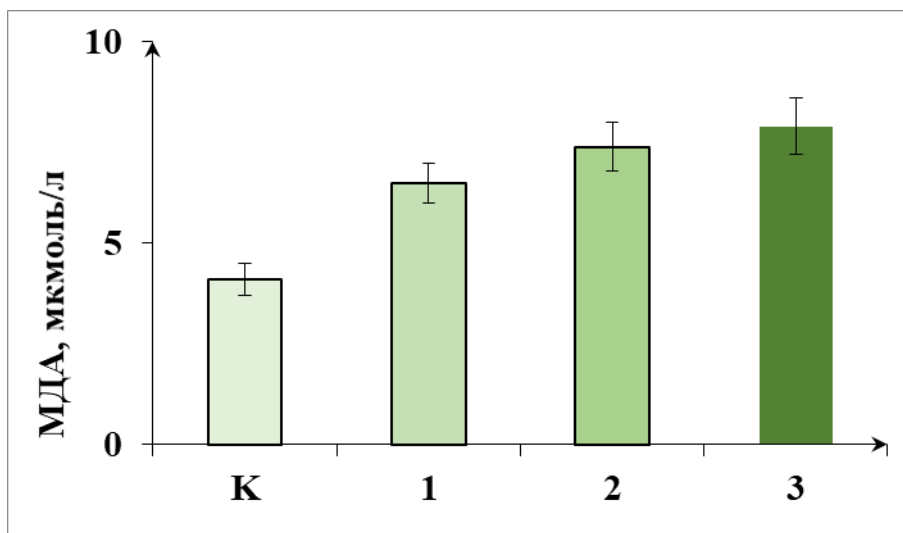


Рис. 5.5. Концентрація малонового діальдегіду у сироватці крові практично здорових осіб (К - контроль) і при дії фторхінолонів (10^{-4} М) – ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3) ($M \pm m$, $n = 8$).

Примітка: зміни вірогідні щодо величин у лімфоцитах осіб контрольної групи, * $p < 0,001$.

За дії на сироватку левофлоксацину (III покоління)- процеси ПОЛ ще більше активуються, концентрація МДА зростає до $(7,4 \pm 0,6)$ мкмоль/л, тобто в 1,8 раза, щодо контрольних значень ($p < 0,001$). Подібна ситуація спостерігається і при визначенні концентрації МДА при дії моксифлоксацину (IV покоління). Моксифлоксацин призводить до зростання МДА в 1,9 раза, до $(7,9 \pm 0,7)$ мкмоль/л ($p < 0,001$). Можна бачити пряму залежність активації процесів ПОЛ від покоління антибіотиків у ряді моксифлоксацин > левофлоксацин > ципрофлоксацин.

Таким чином, при дії фторхінолонів процеси ПОЛ в сироватці крові суттєво інтенсифікуються – в 1,7 – 1,9 раза ($p < 0,001$).

Аналогічна закономірність зберігається і при визначенні концентрації МДА в лімфоцитах периферичної крові. Так, в контролі вона складає $(62,3 \pm 5,1)$ нмоль/мг протеїну, при дії ципрофлоксацину зростає в 1,2

($p < 0,05$), при дії левофлоксацину – в 1,3 ($p < 0,05$), а при дії моксифлоксацину – в 1,6 рази ($p < 0,001$) (рис. 5.6).

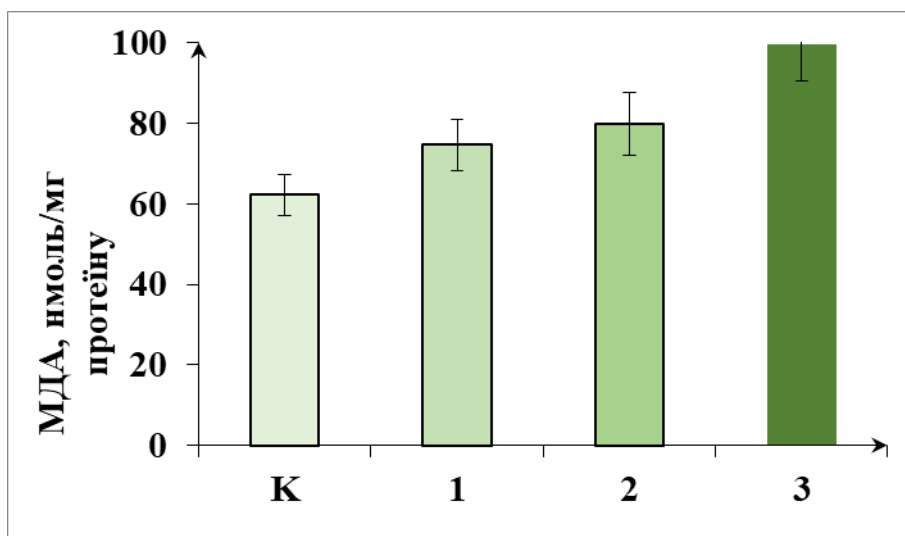


Рис. 5.6. Концентрація малонового діальдегіду в лімфоцитах периферичної крові практично здорових осіб (К - контроль) і при дії фторхінолонів (10^{-4} М) – ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3) ($M \pm m$, $n = 8$).

Примітка: зміни вірогідні щодо величин у лімфоцитах осіб контрольної групи, * $p < 0,001$.

Одночасно з інтенсифікацією процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни і в активності ензимів системи глутатіону.

Так, показано, що в контролі концентрація відновленого глутатіону в лімфоцитах крові складає $(18,1 \pm 1,7)$ нмоль/мг протеїну. При дії на лімфоцити окремо ципрофлоксацину, левофлоксацину чи моксифлоксацину достовірних змін концентрації глутатіону не виявлено, вона коливалась в межах $(17,9 \pm 1,6)$ - $(18,2 \pm 1,7)$ нмоль/мг протеїну (рис. 5.7).

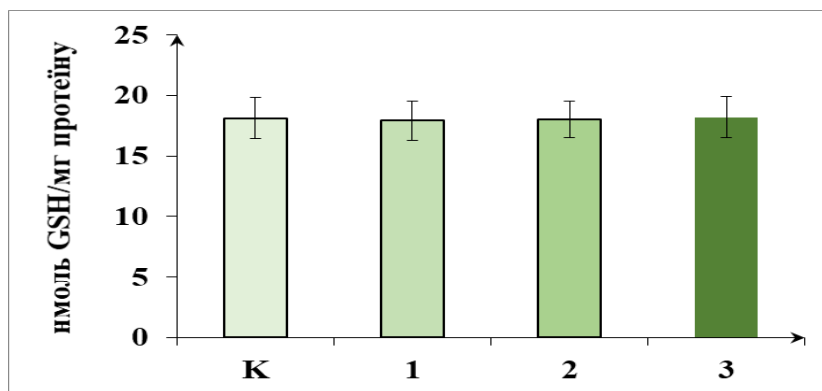


Рис. 5.7. Показники концентрації відновленого глутатіону в лімфоцитах периферичної крові практично здорових осіб (К - контроль) і при дії фторхінолонів (10^{-4} М) – ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3) ($M \pm m$, $n = 8$).

Однак, активність глутатіонпероксидази лімфоцитів, при дії ципрофлоксацину, зростала з ($154,2 \pm 13,4$) нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну (контроль) до ($177,3 \pm 13,7$) ($p > 0,05$), при дії левофлоксацину – до ($189,3 \pm 15,7$) ($p > 0,05$), а при дії моксифлоксацину – до ($199,3 \pm 16,7$) нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$) (рис. 5.8).

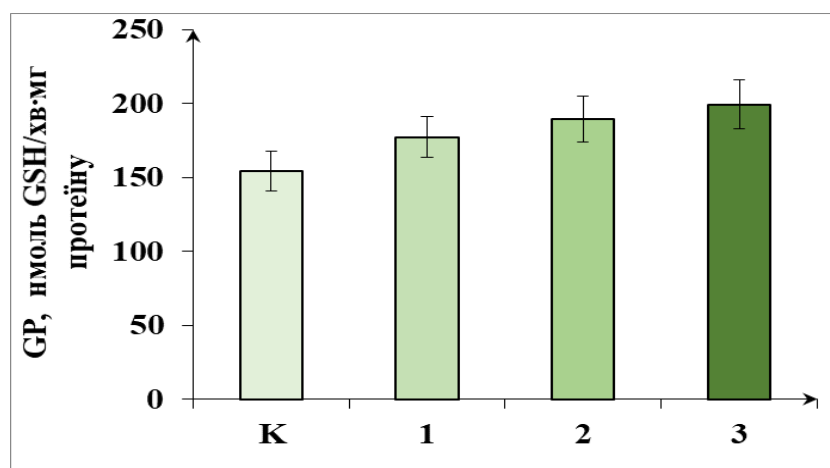


Рис. 5.8. Глутатіонпероксидазна активність в лімфоцитах крові практично здорових жінок (К - контроль) і при дії фторхінолонів – ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3). $M \pm m$, $n=8-12$.

Примітка: зміни вірогідні, щодо величин у лімфоцитах осіб контрольної групи, * $p < 0,001$.

Тобто, достовірне зростання активності глутатіонпероксидази відбувається тільки при дії моксифлоксацину, в 1,3 раза.

Щодо активності глутатіонредуктази, то в лімфоцитах в контролі вона складала $(51,7 \pm 4,2)$ нмоль NADPH/ хв на 1 мг протеїну (рис. 5.9).

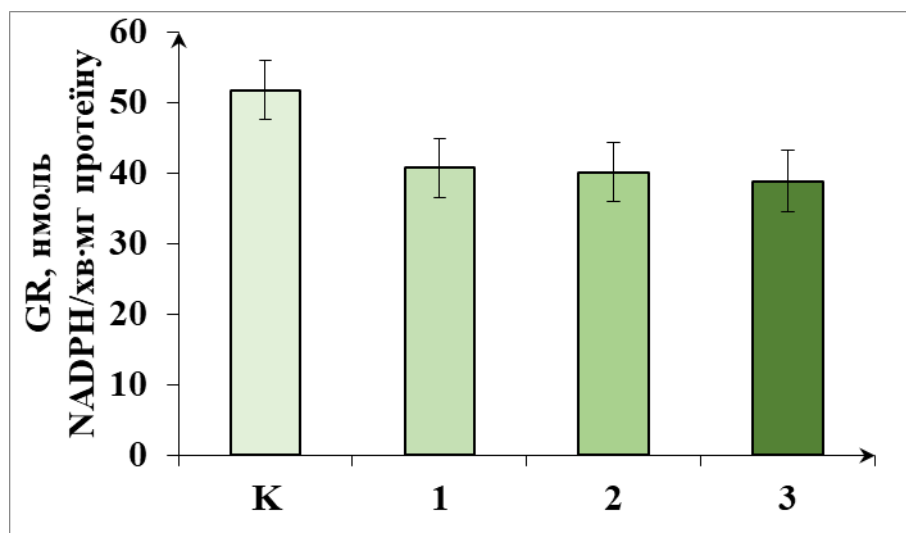


Рис. 5.9. Глутатіонредуктазна активність в лімфоцитах крові практично здорових жінок (К - контроль) і при дії фторхінолонів – ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3) ($M \pm m$, $n=8-12$).

Примітка: зміни вірогідні щодо величин у лімфоцитах осіб контрольної групи, * $p < 0,001$.

При дії ципрофлоксацину вона знижувалась до $(40,7 \pm 4,2)$ ($p < 0,05$), левофлоксацину – до $(40,1 \pm 4,2)$ ($p < 0,05$), а при дії моксифлоксацину – до $38,9 \pm 4,1$ нмоль NADPH/ хв·мг протеїну ($p < 0,05$).

Активність глутатіон-S трансферази в лімфоцитах в контролі складала $(112,2 \pm 9,2)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну (рис. 5.10). При дії ципрофлоксацину вона зростає в 2,3 ($p < 0,001$), левофлоксацину – в 3,1 ($p < 0,001$), а моксифлоксацину – в 3,8 раза ($p < 0,001$).

Таким чином, дані антибіотики суттєво активують процеси ПОЛ у лімфоцитах та одночасно активують основні ензими антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидазу та глутатіонтрансферазу. Щодо активності

глутатіонредуктази, що відновлює окиснений глутатіон, то її активність знижувалась.

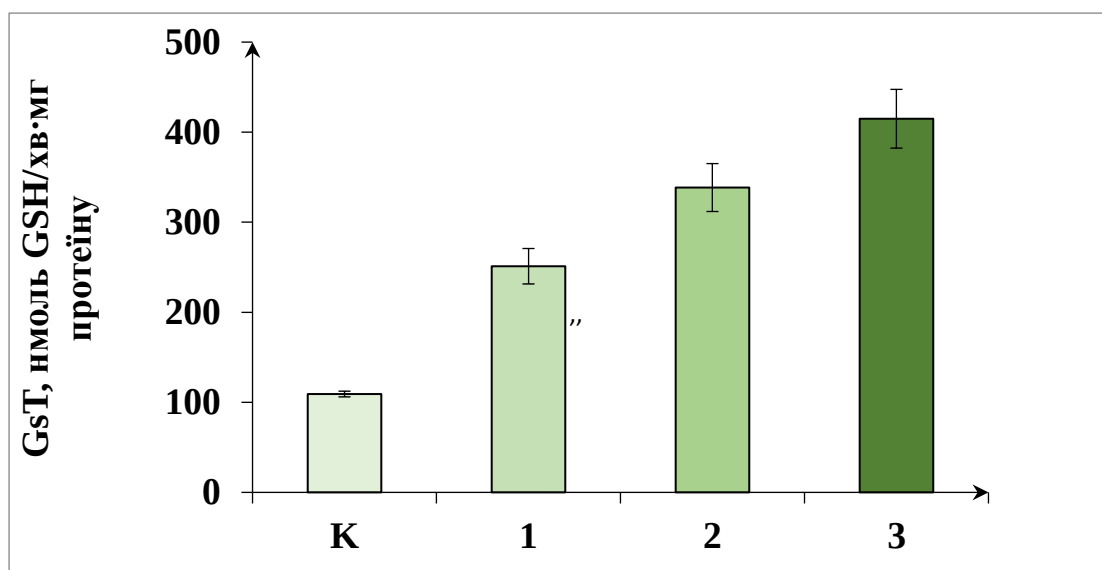


Рис. 5.10. Глутатіон-S трансферазна активність в лімфоцитах крові практично здорових жінок (К - контроль) і при дії фторхінолонів – ципрофлоксацину (1), левофлоксацину (2) та моксифлоксацину (3) ($M \pm m$, $n=8-12$).

Примітка: зміни вірогідні, щодо величин у лімфоцитах осіб контрольної групи, $*p < 0,001$.

Активацію ензимів ГП та ГТ, за відсутності ендogenous синтезу відновленого глутатіону, можна пояснити тим, що дослідження проводились *in vitro* при оптимальних концентраціях субстратів у середовищах інкубації.

Отримані результати погоджуються з деякими літературними даними, де показано, що моксифлоксацин, у нормальних меланоцитах, призводить до зростання концентрації МДА, а також активує глутатіонпероксидазу, супероксиддисмутазу та каталазу [102]. Також було показано, що моксифлоксацин призводить до зростання концентрації МДА в гепатоцитах, однак, одночасно знижує активності каталази, супероксиддисмутази та глутатіонтрансферази [130, 181]. З іншого боку було показано, що фторхінолон гатифлоксацин-дозозалежно призводить до зростання концентрації малонового діальдегіду та одночасного зниження активності

супероксиддисмутази та рівня глутатіону в крові, зростання активностей каталази, глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Тровафлоксацин спричиняв гепатотоксичний ефект і пероксинітритний стрес мітохондрій та їх дисфункцію [139]. Інший фторхінолон енрофлоксацин не спричиняв оксидативний стрес крові, не впливав на активність ензимів глутатінової антиоксидантної системи. Однак, ряд даних свідчать, що фторхінолини здатні індукувати оксидативний стрес [173, 191, 207].

Висновок. Фторхінолини активують процеси пероксидації ліпідів у лімфоцитах крові. Фторхінолини не впливають на концентрацію відновленого глутатіону в лімфоцитах крові, однак призводять до зростання активності глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Однак, ймовірно, існують певні відмінності в механізмах дії різних фторхінолонів і в особливостях реакції на них різних органів і тканин.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях:

1. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Melnyk OV, Korchynska OS, Vorobets NM, Vorobets ZD. Effect of fluoroquinolones on the activity of the glutathione system in the peripheral blood lymphocytes. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2019;3(87):23-9.
2. Kovalenko IV, Onufrovych OK, Fafula RV, Melnyk OV, Vorobets ZD. Characteristics of antioxidant and NO-synthase systems of blood lymphocytes under the action of decamethoxine. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2020;1(88):15-22.
3. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Воробець ЗД. Вплив декаметоксину на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної та антиоксидантної систем лімфоцитів крові. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю. Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження, присвяченій 75-й річниці університету та

20-й річниці створення фармацевтичного факультету; 2020 трав. 19-20;
Івано-Франківськ; 2020, с. 126-7.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Особливу актуальність, в сучасних умовах, викликає з'ясування механізму дії антисептиків та антибіотиків на грампозитивні і грамнегативні бактерії та їх одночасного впливу на макроорганізм, його регуляторні та ензиматичні системи.

Антисептики та антибіотики широко використовуються в системі протимікробних заходів для профілактики та лікування інфекційних хворіб [11, 12, 67, 78, 183, 184, 189, 202, 203]. До протимікробних речовин належать хімічні сполуки, що проявляють широку протимікробну дію, в невеликих дозах не шкодять організму. Ці речовини можуть бути різного походження. Антисептичні препарати мають здебільшого мікробоцидну дію на поверхні шкіри, слизових оболонок, ранових поверхнях, порожнинах тіла [9, 70]. Вони розчиняються у воді та ліпідах. Одним із найпоширеніших антисептиків є лікарський препарат декаметоксин. На основі нього виготовлені і інші препарати – горостен, декасан, аурідексан, септефріл тощо [61, 63, 64].

Ефективність антисептиків визначається такими властивостями як здатністю локалізувати збудника в рані, запобігати його розповсюдженню і проникненню до лімфатичного та кровоносного русла, знижувати адгезивні властивості мікроорганізмів, пригнічувати фактори патогенності бактерій, забезпечувати тривалий антимікробний ефект, підсилювати дію антибіотиків і різних фізичних факторів [70]. Антимікробна активність антисептичних препаратів обумовлена деструкцією мікробних структур (клітинної стінки, мезосом, нуклеїду тощо), окиснення органічних речовин мікробної клітини, що призводить до загибелі останньої [12, 13]. Особливу увагу слід приділити мембраноатакуючій дії антисептиків на цитоплазматичну мембрану, що призводить до порушення активного транспорту метаболітів, синтезу протеїну, поділу клітин.

З іншого боку, для лікування важких хворих із гнійно-запальними захворюваннями, зокрема спричинених золотистим стафілококом, широко використовують фторхінолони - ципрофлоксацин, левофлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин [67, 220]. Механізм дії фторхінолонів на мікробну клітину відрізняється від дії інших антимікробних лікарських засобів. Він полягає у пригніченні ДНК-гірази (топоізомерази) бактерій – ензиму, що забезпечує суперспіралізацію ДНК [21, 129, 172]. Це призводить до порушення біосинтезу ДНК, РНК і білка в мікробній клітині та її загибелі. Під дією фторхінолонів- знижуються агресивні властивості бактерій, підвищується чутливість мікроорганізмів до фагоцитозу. Препарати цієї групи мають здатність діяти на мікроорганізми не тільки в період росту [130, 141, 202, 219].

Фторхінолони III-IV поколінь, на відміну від фторхінолонів II покоління, блокують ще одну мішень в оболонці бактерій – топоізомеразу 4. Доведено, що цей ензим в основному блокується у грампозитивних бактерій, тоді як ДНК-гіраза – у грамнегативних.

Таким чином, антисептики та антибіотики суттєво впливають на перебіг інфекційного процесу.

Оскільки декаметоксин і фторхінолони володіють гідрофільними та ліпофільними властивостями, вони через ранові поверхні, слизові оболонки, шкіру тощо можуть проникати в клітини, кров, розноситись кров'ю до різних органів і тканин і, таким чином, спричиняти різноманітні біохімічні ефекти. У цьому плані біологічна дія декаметоксину та фторхінолонів дуже мало досліджена.

Для виявлення патологічних процесів, фізіологічних і біохімічних змін організму, зокрема спричинених дією фармпрепаратів, йде пошук нових біохімічних та інших маркерів, застосовуються біохімічні та інші методи досліджень. В цьому аспекті, важлива роль Нітроген (II) оксиду (NO, оксид азоту), як універсального клітинного та тканинного метаболіту в регуляції

клітинних функцій і паракринного регулятора міжклітинних і міжсистемних взаємодій, не викликає сумніву [113, 144-148, 151].

Синтез NO здійснюється за участю NO-синтази (EC 1.14.13.39) з *L*-аргініну шляхом окисного перетворення [105, 167-169, 171]. *L*-аргінін також метаболізується за участю аргінази. Баланс між регуляторними фізіологічними та цитотоксичними властивостями значною мірою обумовлений локальною концентрацією NO, а також метаболічним статусом тканин, у яких синтезується та реалізує свій ефект NO [128, 132, 133, 162-171, 188, 197]. Водночас відомо, що, залежно від концентрації, метаболіти циклу NO можуть виявляти як про- так і антипроліферативний ефект, зокрема антионкогенний [134, 158, 178, 180, 192, 193, 217]. NO може брати участь в промоції канцерогенезу, як модифікатор метаболізму ксенобіотиків, а також чинник, що порушує вільнорадикальний гомеостаз, стимулюючи ангіогенез і ріст пухлин [32, 89, 96, 107, 134, 209]. Патологічні процеси, що відбуваються у клітинах, зумовлені, перш за все, порушенням регуляторних систем, активацією процесів пероксидації ліпідів і порушенням системи антиоксидантного захисту [89, 115, 118, 131, 210].

У результаті окисно-відновних реакцій, в організмі людини чи тварин, постійно проходить генерація активних форм кисню (АФК), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах: регуляції тону судин, клітинній проліферації, синтезі простагландинів, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, які контролюють експресію генів, мікробіцидну дію фагоцитів тощо. До АФК належать вільні радикали, продукти неповного відновлення атомарного кисню, а також пероксид водню, синглетний кисень, озон, гіпохлорит, пероксинітрит. За умов фізіологічного стану організму, концентрація АФК у тканинах є невисокою [1, 6, 201, 208].

За дії екстремальних факторів різного походження (запальні процеси, хімічне забруднення, токсичні речовини тощо), утворення АФК у живих організмів інтенсифікується. Під дією АФК у клітинах проходить

активація експресії редокс-чутливих генів, багато з яких необхідні для захисту клітин від токсичної дії оксидативного стресу, зокрема активується синтез таких антиоксидантних ензимів як глутатіонпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S трансфераза .

Однією з основних причин пошкодження і загибелі клітини, внаслідок дії АФК, на сьогодні вважається- пероксидне окиснення ліпідів [1]. Цим шляхом окиснюються ненасичені жирні кислоти, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран. [6]. Це призводить до змін активності аргіназо-NO-синтазної та іон-транспортувальних систем і, відповідно до зміни концентрації NO та Ca^{2+} в клітині, які є внутрішньоклітинними месенджерами і, прямо чи опосередковано, регулюють більшість клітинних функцій [17, 44, 46, 214].

Вважається, що лімфоцити периферичної крові є «метаболічним дзеркалом» організму, а, відтак, можуть слугувати моделлю для вивчення впливу антисептиків та антибіотиків на метаболічні та регуляторні системи клітини [15, 81, 106, 107].

Виходячи з цього, нами проведені дослідження щодо антибактеріальних властивостей декаметоксину та фторхінолонів і їх впливу на активність ензимів аргіназа/NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної систем лімфоцитів крові макроорганізму.

Незважаючи на значну кількість досліджень, в Україні, антисептичного лікарського засобу декаметоксин, вивчення його мікробіцидних, фізико-хімічних і, особливо, біохімічних властивостей, залишається актуальною проблемою.

У результаті проведених досліджень встановлено, що ДКМ і його лікарська форма ДС, проявляли однакову мікробіцидну активність щодо музейних штамів *E. coli* (15,62 мкг/мл), *C. albicans* (16 мкг/мл), *E. faecalis* (0,97 мкг/мл), *Bac. subtilis* (0,24 мкг/мл). ДС був менш мікробіцидно активним щодо *S. aureus* (0,48 мкг/мл) у порівнянні з ДКМ (0,24 мкг/мл).

Також ДС був менш мікробіцидно активним щодо *P. aeruginosa* (250 мкг/мл), ніж ДКМ (62,5 мкг/мл). Однак, обидві субстанції, відповідно до інструкції із застосування лікарських форм ДКМ, не рекомендовано для профілактики та лікування інфекційних ускладнень, спричинених *P. Aeruginosa*. Невідповідність у бактерицидній дії ДКМ і ДС щодо *S. aureus* ATCC 25923 та *P. aeruginosa* і те що ДКМ у 2 – 4 рази активніший щодо цих штамів свідчить, що виробникам необхідно провести відповідні заходи щодо покращення якості для досягнення мікробіцидної активності препарату на рівні патентованого взірця ДКМ.

Аналіз результатів дослідження чутливості клінічних штамів мікроорганізмів до ДКМ та ДС показав високу бактерицидну дію на штами *S. epidermidis* (від $(1,16 \pm 0,14)$ до $(1,45 \pm 0,15)$ мкг/мл); *S. aureus* (від $(1,19 \pm 0,59)$ до $(1,52 \pm 0,67)$ мкг/мл); *E. coli* (від $(15,62 \pm 1,3)$ до $(18,46 \pm 1,8)$ мкг/мл); *P. Aeruginosa* (від $(36,5 \pm 7,91)$ до $(39,48 \pm 6,85)$ мкг/мл), фунгіцидну дію на *C. albicans* (від $(13,39 \pm 1,12)$ до $(15,63 \pm 1,13)$ мкг/мл). Встановлено, що ДС має дещо нижчу протимікробну активність порівняно з ДКМ. В цілому, дослідження протимікробної активності показали їх високу протимікробну ефективність.

Таким чином, обидва препарати ДКМ і ДС мікробіцидно діють на стафілококи, ентерококи, кишкову паличку та *Candida albicans*. Проте, патентований взірець ДКМ за мікробіцидною дією переважає ДС.

Відомо, що однією з ранніх стадій інфекційного процесу є адгезія збудника в тканинах. Адгезія та колонізація служать пусковими механізмами інфекційного процесу. Мікроорганізми, активно долаючи природні захисні бар'єри макроорганізму, прикріплюються до поверхні клітин шкіри, слизових оболонок за допомогою адгезинів, що взаємодіють з клітинами макроорганізму. Специфічна адгезія відбувається внаслідок молекулярної взаємодії між адгезинами мікробної клітини та рецепторами клітин господаря. Адгезини належать до поверхневих структур мікробних клітин, до складу яких входять макромолекули лектинів, протеїнів і здатні зв'язувати карбогідрати.

Рецептори адгезинів знаходяться на поверхні клітин у вигляді протеїнових фрагментів [13, 53].

Бактерії можуть прикріплюватися до клітин макроорганізму, завдяки наявності пілей, лектиноподібних структур, водневих зв'язків, сил Ван-дер-Ваальса, а також електростатичної взаємодії. Лікарські антисептичні засоби мають властивість інактивувати біохімічні, фізіологічні процеси мікроорганізмів. Антимікробні препарати здатні порушувати життєдіяльність збудників інфекційних захворювань, зокрема, спричиняти структурні зміни клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани та структур, що приймають участь в адгезії мікроорганізмів; порушення синтезу протеїну в рибосомах; блокування процесів метаболізму в збудників; порушення реплікації, синтезу нуклеїнових кислот в клітинах мікроорганізмів.

На підставі результатів досліджень встановлено, що ДКМ та ДС, в різних бактеріостатичних (МБсК) і бактеріоцидних (МБцК) концентраціях, суттєво діють на адгезивну здатність стафілококів та ешерихій.

В контрольних дослідах- клітини грампозитивних (стафілокок), грамнегативних (ешерихії) бактерій - 100 % адгезувались на формалінізованих еритроцитах людини. Доведено, що в присутності МБсК антисептиків, відсоток адгезованих бактеріальних клітин стафілококів- зменшився в присутності ДКМ - (0,48–0,96) мкг/мл на 57,64–63,07 % відповідно; в присутності декасану - 1,9 мкг/мл на 58,46–59,60 %, відповідно. Встановлено, що за присутності мінімальних бактеріостатичних концентрацій лікарських препаратів, відсоток бактеріальних клітин ешерихій, стафілококів суттєво зменшився у присутності ДКМ 3,8 мкг/мл на 31,68– 42,36 %, відповідно; декасану 3,8 мкг/мл на 21,72–41,54 %, відповідно.

Доведено, що мінімальні бактерицидні концентрації лікарських антибактеріальних препаратів значно інтенсивніше пригнічували адгезивний процес ешерихій в наступних межах: в присутності ДКМ (7,6–15,2) мкг/мл - пригнічували адгезію ешерихій на 22,05–24,42 %), декасан 15,2 мкг/мл 26,48 – 26,51 %, відповідно.

Таким чином, антисептичні препарати ДКМ та ДС ефективно діють на адгезини стафілококів та ешерихій. Доведено, що ДКМ і ДС, в досліджуваних МБсК (0,48–3,8) мкг/мл, МБцК (7,6–15,2) мкг/мл, забезпечують потужну дію на адгезини бактерій, що може спричиняти високий профілактичний і лікувальний ефекти в процесі застосування цих лікарських антимікробних засобів.

Формування мікроорганізмами стійкості до лікарських антисептичних препаратів, потрібно розглядати як універсальне біологічне явище, що забезпечує збереження цих видів у несприятливих умовах існування. Збудники інфекційних хвороб людини володіють природною здатністю набувати резистентності до різних фізичних, хімічних, біологічних факторів і чинників. Внаслідок селективної дії антимікробних засобів, відбувається елімінація чутливих мікробів їхньої популяції та розмноження, резистентних до ліків, варіантів збудників захворювань [63, 198].

В результаті проведених досліджень встановлено, що штами стафілококів повільно формують стійкість до ДКМ. Після п'яти пасажів, резистентність двох штамів стафілококу збільшилась у два рази, після 10 пасажів – у чотири рази, після 15 пасажів – у 8 разів, після 20 пасажів – у 8-16 разів, після 25 пасажів – у 32 рази. 30-ти кратне пасажування показало, що резистентність до ДКМ у *S. aureus* ATCC 25923 зросла в 64 рази, а в *S. aureus* 27 – у 32 рази.

Отримані дані свідчать, що резистентність штамів стафілококу до ДКМ формувалась в результаті багатоступеневих мутацій. Встановлено, що чутливість штамів стафілококу до ДКМ, за присутності мінімальних бактерицидних концентрацій (МБцК), знаходилась в межах 3,9-7,8 мкг/мл, що забезпечували ефективне застосування в клініці.

Відомо, що крім бактерій (стафілококи, стрептококи, коринебактерії) з високою чутливістю до лікарських антисептичних засобів, які містять в молекулі чотирьохвалентний азот, існують інші мікроорганізми з природною чутливістю до цих препаратів. До них належать *Candida albicans*, які мають

інші біологічні ознаки, тому було цікаво дослідити формування резистентності у штамів *Candida albicans* до препаратів ДКМ.

Доведено, що резистентність до ДКМ у *Candida albicans* формується повільно. Так, після 30 пасажів на поживних середовищах у присутності ДКМ стійкість у *Candida albicans* зросла в 16 разів.

Показано, що в процесі формування резистентності до ДКМ, має місце зміна морфології мікроорганізмів з утворенням поліморфних мікробних клітин. Резистентні біовари стафілококу втрачали здатність утворювати золотисті пігменти. На твердих поживних середовищах- повільно (2-3 доба) утворювали- в 2 рази дрібніші колонії ,в порівнянні з колоніями в контрольних посівах, без антисептиків. В процесі формування резистентності, штами стафілококу втрачають здатність утворювати гемолізину, лецитовітелазу; повільно гідролізували вуглеводи, багатоатомні спирти, порівняно з контрольними дослідями.

Встановлено, що дослідні штами *Candida albicans*, в процесі формування резистентності до ДКМ, змінюють морфологію, культуральні властивості на середовищах з антисептиком. Характеризуються повільним ростом. Резистентні штами грибів проростають в два рази повільніше контрольних культур. На щільному поживному середовищі Сабуро- відмічали дисоціацію штамів *Candida albicans*: з гладеньких (S-форма) в шорсткі (R-форма) колонії. Важливо підкреслити, що штами *Candida albicans* повільніше (6-7 доба) ферментували вуглеводи, ніж в контролі (24-28 годин).

На лікувальну та профілактичну активність ліків можуть впливати технологія виготовлення лікарських препаратів, їх склад, лікарська форма (таблетки, капсули, розчини, мазі тощо), тому цікаво було дослідити формування резистентності мікроорганізмів до ДС.

Результати дослідження формування стійкості до лікарської форми декаментоксину – декасану показало, що *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 27 формували резистентність до ДС, яка зросла в 4-8 разів (1,95 мкг/мл) після 10 пасажів культивування. Після 20 пасажів стійкість стафілококів до ДС

зростала в 16 разів (МБсК – 3,90 мкг/мл); після 30 пасажів зросла в 64 рази, відповідно. МБсК ДС при цьому не перевищувала – 7,80 мкг/мл.

В наступних дослідженнях формування резистентності штамів *C. albicans* 14, *C. albicans* 51 до ДС доведено, що їх стійкість збільшилась, після 10 пасажу, - у 8 разів, після 20- в 16 разів (МФсК 15,6 мкг/мл). Після 30 пасажів тест-штами *C. albicans* були в 32 рази стійкішими, порівняно з вихідним рівнем, а МФсК щодо досліджуваних кандид,- становили 62,50 мкг/мл, що свідчить про достатню діючу концентрацію лікарського антисептичного препарату ДС для профілактики, лікування кандидозної інфекції.

Таким чином, лікарські препарати декаметоксин і декасан проявляють високі антимікробні властивості до штамів стафілококів, *Candida albicans*. Доведено, що у стафілококів, *C. albicans* повільно формується стійкість *in vitro* до декаметоксину та декасану, яка після 30 пасажів збільшується у 16-64 рази. В процесі формування резистентності у стафілококів, *C. albicans* має місце значне пригнічення їх біологічних властивостей, що ймовірно зумовлено порушенням функціональної активності ензимів мікробних клітин.

Прогресуюча поліантибіотикорезистентність в межах популяції; на рівні медичних закладів спонукає до глибокого дослідження проблеми стійкості стафілокока до різних груп антибіотиків. В сучасних умовах, доцільним залишається вивчення чутливості *S. aureus* до фторхінолонів, які є препаратами резерву і постійно застосовують в лікуванні важко хворих з гнійно-запальними захворюваннями.

В результаті проведеного комплексного математико-статистичного аналізу результатів мікробіологічного дослідження чутливості клінічних штамів *S. aureus* до ципрофлоксацину, встановлено низьку чутливість цих бактерій у 2011 р. (44 %). При подальшому аналізі результатів, за період 2011-2015 р.,- отримали математичну формулу, що описує тенденцію чутливості *S. aureus* до ципрофлоксацину у вигляді параболічної функції. Помірне відновлення чутливості клінічних штамів золотистого стафілококу до ципрофлоксацину відбувалось до 2015 р. (80 %). Проте, математична

екстраполяція попередньої закономірності, в майбутньому свідчить про зниження чутливості золотистого стафілококу до ципрофлоксацину.

Прогностичний аналіз згладженого ряду показників чутливості до левофлоксацину, за період 2011 – 2015 рр. показав, що динаміка даного показника, в клінічних штамів *S. aureus*, має лінійно зростаючий характер.

У дослідженні спостерігали поступове збільшення кількості чутливих до левофлоксацину штамів золотистого стафілококу (94,11 % у 2015 р.). Така тенденція свідчить про позитивний короткотривалий прогноз щодо антистафілокової ефективності левофлоксацину.

Прогнозування рівня чутливості золотистого стафілококу, який колонізував опікові рани, вказує на тенденцію поступового відновлення чутливості до моксифлоксацину. Очікувані значення чутливості до моксифлоксацину (92,5 %) ще раз свідчать про можливу неефективність застосування фторхінолонів без попереднього мікробіологічного визначення їх чутливості.

Аналіз багаторічного дослідження чутливості золотистого стафілококу до моксифлоксацину демонструє позитивну динаміку. Це свідчить про очікувані перспективи ефективної профілактики, лікування моксифлоксацином стафілокової інфекції у важкохворих з опіками.

Таким чином, за результатами проведених досліджень, вперше отримані прогностичні аналітичні вирази динаміки чутливості до фторхінолонів клінічних штамів *S. aureus*, що спричиняли у хворих із важкими опіками гнійно-запальні ускладнення. У клінічних штамів золотистого стафілокока, прогнозована чутливість до ципрофлоксацину, має тенденцію до зниження, а до левофлоксацину - зростання. Високою є чутливість *S. aureus* до моксифлоксацину (92,5 %).

Оскільки декаметоксин володіє гідрофільними та ліпофільними властивостями, він через ранові поверхні, слизові оболонки, шкіру тощо може проникати в клітини, кров, розноситись кров'ю до різних органів і тканин і, таким чином, спричиняти різноманітні біохімічні ефекти, зокрема щодо

регуляторної NO-синтазної системи клітин. У цьому плані біологічна дія декаметоксину практично не досліджена.

Аргіназа – металоензим, що каталізує гідроліз *L*-аргініну до *L*-орнітину та сечовини, а також конкурує з NO-синтазою за субстрат - *L*-аргінін. Практично відсутні дані щодо змін активності аргінази при дії антисептиків, зокрема декаметоксину та, в меншій мірі, антибіотиків фторхінолонового ряду.

При визначенні оптимальних концентрацій субстратів для функціонування аргінази в лімфоцитах периферичної крові та з'ясування ряду кінетичних параметрів для ензиматичної реакції аргінази- *L*-аргінін вносили в середовище інкубації в діапазоні концентрацій від 1 до 200 мМ (за сталої оптимальної концентрації Mn^{2+} - 2 мМ).

Декаметоксин у концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності. При 10^{-5} М концентрації препарату – в 1,2 , а при 10^{-2} М концентрації до $(175,1 \pm 8,8)$ нмоль сечовини/хв·мг протеїну, тобто в 1,4 раза щодо контролю ($p < 0,05$).

При дії, на лімфоцити крові, фторхінолонів також спостерігається концентраційнозалежне зростання ензиматичної активності аргінази, з виходом на плато при 150 мМ концентрації *L*-аргініну. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій *L*-аргініну, активність аргінази при дії фторхінолонів, була підвищена, у порівнянні з такою величиною в контрольній групі. Активність зростала в ряді: контроль → ципрофлоксацин → левофлоксацин → моксифлоксацин. Ці дані прямо корелюють з поколіннями фторхінолонів. Ципрофлоксацин належить до II покоління, левофлоксацин – до III покоління. Найвища активність спостерігається при дії моксифлоксацину, який належить до IV покоління [21, 82, 88].

На основі лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера - Берка показаний змішаний тип інгібування активності ензиму та визначено основні кінетичні параметри метаболізму *L*-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові групи контролю та при дії

фторхінолонів. Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість (V_{max}) метаболізму *L*-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові при дії ципрофлоксацину у 1,4 ($p<0,05$), левофлоксацину в 1,6 ($p<0,05$), а моксифлоксацину в 1,9 ($p<0,001$) рази вищі щодо контрольних значень. Константа спорідненості до *L*-аргініну (K_{L-arg}) у лімфоцитах крові при цьому зростає, при дії ципрофлоксацину у 1,5 ($p<0,05$), левофлоксацину в 1,6 ($p<0,05$), а моксифлоксацину в 2,1 ($p<0,001$) рази щодо групи контролю. Отже, при інтерпритації отриманих даних, визначених за *L*-аргініном, можна дійти висновку, що зростання активності аргінази в лімфоцитах при дії фторхінолонів відбувається за рахунок зростання числа обертів ензиму (V_{max} зростає), хоча спорідненість субстрату до ензиму знижується (K_{L-arg} – зростає).

Показано, що аргіназна активність лімфоцитів крові практично здорових осіб (фізіологічна норма), при оптимальних концентраціях аргініну (150 мМ) та за відсутності фторхінолонів, становить ($124,2 \pm 8,8$ нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну). При дії антибіотиків фторхінолонового ряду на лімфоцити крові в концентраціях із 10^{-5} до 10^{-2} М- ця активність дозозалежно зростає. При концентрації досліджуваних фторхінолонів 10^{-4} М це зростання для ципрофлоксацину в 2,3 рази ($p<0,001$), для левофлоксацину в 2,6 рази ($p<0,001$), а для моксифлоксацину в 3,1 рази ($p<0,001$).

Таким чином, отримані результати доводять, що при дії фторхінолонів суттєво зростає аргіназна активність лімфоцитів периферичної крові, що перш за все, обумовлено збільшенням спорідненості ензиму до субстрату та зростанням максимальної швидкості реакції.

Оскільки *L*-аргінін є субстратом не тільки для аргінази, але й для всіх ізоформ NO-синтази, наступним етапом роботи було вивчення активності окремих ізоформ NO-синтази та їх кінетичних особливостей при дії декаметоксину та фторхінолонів.

Згідно даних літератури, в лімфоцитах крові ідентифіковано всі ізоформи NOS [57, 157, 197].

Показано, що активність конститутивної ізоформи NO-синтази в контролі складає $(71,4 \pm 6,9)$, а активність індукцйбельної ізоформи - $(1,58 \pm 0,18)$ нмоль NADPH(H⁺)/хв на 1 мг протеїну. За дії декаметоксину, в концентрації 10^{-5} М активність cNOS знижувалась в 1,25 раза ($p < 0,05$), а активність iNOS зростала в 10,8 раза ($p < 0,001$) щодо контрольних значень.

Таким чином, з'ясовано, що антисептик декаметоксин суттєво впливає на регуляторні механізми клітини, зокрема лімфоцитів крові. Стимулює активність аргінази та інгібує активність cNOS із одночасною активацією iNOS.

В результаті проведених досліджень щодо впливу фторхінолонів на активність окремих ізоформ NO-синтази, встановлено, що активність cNOS лімфоцитів крові, практично здорових жінок, становить $(71,4 \pm 6,9)$ нмоль NADPH(H⁺)/хв на 1 мг протеїну. Аналіз літературних даних свідчить про значну варіабельність абсолютних значень ензиматичної активності NOS лімфоцитів крові, що, ймовірно, обумовлено різноманітними методологічними підходами до вивчення активності ензиму.

В лімфоцитах крові, при дії досліджуваних фторхінолонів у концентрації 10^{-4} М, моксифлоксацин зумовлює зниження активності cNOS в 10,2 раза ($p < 0,001$), левофлоксацин – у 5,5 раза ($p < 0,001$) та левофлоксацин – у 4,2 раза ($p < 0,001$) щодо групи контролю.

Відомо, що cNOS продукує низькі концентрації NO, в той час як iNOS синтезує високі концентрації NO (> 300 нМ) [17]. iNOS є кальцій-незалежною ізоформою NOS і, на відміну від cNOS, не експресується постійно (конститутивно).

Встановлено, що активність iNOS лімфоцитів крові, клінічно здорових жінок, ідентифікується в незначній мірі, практично на межі похибки, та становить $(1,58 \pm 0,18)$ нмоль NADPH(H⁺)/хв на 1 мг протеїну.

При вивченні впливу фторхінолонів на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових жінок, її активації ми не спостерігали, а інгібуючий ефект - неможливо було визначити через низьку активність. Для

індукування активності iNOS в лімфоцитах крові використовували оксидативний стрес, преінкубуючи лімоцити з H_2O_2 . Преінкубація лімфоцитів із 0,2 мМ H_2O_2 призводить до зростання активності iNOS в 31,3 раза, з $(1,58 \pm 0,18)$ до $(34,3 \pm 0,18)$ нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну. На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, ципрофлоксацин призводить до інгібування активності ензиму в 1,2 раза ($p < 0,05$), левофлоксацин – у 1,4 ($p < 0,05$), а моксифлоксацин – у 2,3 раза ($p < 0,001$). Ці дані корелюють з поколіннями антибіотиків.

Слід відмітити, що подібні результати щодо інгібування фторхінолонами iNOS отримані і на інших об'єктах. Так, показано, що моксифлоксацин і ципрофлоксацин інгібують iNOS в епітеліальних клітинах дихальних шляхів і прямої кишки людини [117, 123, 143]. Стимуляція клітин цитокінами призводить до зростання рівня NO в 3,3 раза, а моксифлоксацин пригнічує це зростання на 68 %. Також зростання активності iNOS інгібувалось попереднім додаванням до клітин моксифлоксацину на 62 %.

Подібні результати щодо інгібування iNOS ципрофлоксацином отримані *in vivo* при лікуванні, резистентної до ліків стрептококової пневмонії [117, 152]. Показано, що терапія цим препаратом призводить до значного зниження NO через 8 год після антибактеріотерапії, яке спостерігалось до кінця 24 год.

Щодо мікробіологічної характеристики, то ципрофлоксацин (II покоління) є «золотим стандартом» серед фторхінолонів [202, 203]. Хоча, моксифлоксацин, серед інших фторхінолонів, є найбільш ефективним, безпечним антибактеріальним препаратом, зокрема, щодо лікування інфекцій органів дихання. Він володіє широким спектром антимікробної активності, дуже позитивними фармакокінетичними властивостями, високою клінічною ефективністю при інфекціях верхніх і нижніх дихальних шляхів і доброю переносимістю.

Таким чином, в той час, як антимікробні властивості фторхінолонів, здебільшого, вивчені, їх паралельна дія на біохімічні процеси та регуляторні механізми клітин макроорганізму - практично не досліджені.

Отримані нами результати, щодо дії фторхінолонів, вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що призводить до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів, зокрема, регуляторної функції NO. Зниження індукованої H_2O_2 активності iNOS, за дії фторхінолонів, свідчить про те, що ці антибіотики можуть запобігати гіперпродукції NO в лімфоцитах крові. Відомо, що NO, що продукується у надмірній кількості при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію, внаслідок утворення пероксинітриду – продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини [17, 31]. Ймовірно, що одним із механізмів дії фторхінолонів є зниження гіперпродукції NO.

За фізіологічних умов, аргіназа регулює концентрацію *L*-аргініну в клітині та інгібує активність NOS шляхом конкурування за спільний субстрат, і, таким чином, безпосередньо регулює синтез NO [100, 111, 116].

L-аргінін є єдиним субстратом для синтезу NO всіма формами NOS. Доступність внутрішньоклітинного *L*-аргініну є лімітуючим фактором NO-синтезу і потенційним механізмом контролю регуляторної функції NO, оскільки більшість типів клітин не здатні синтезувати *L*-аргінін і потребують його екзогенного надходження. *L*-аргінін виступає ключовою молекулою у низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які зазнають серйозних змін під час різних патологічних станів [32, 128, 144, 150].

Таким чином, зростання активності аргінази лімфоцитів крові при дії фторхінолонів, свідчить про загальну потребу клітин в *L*-аргініні.

Судячи з отриманих нами результатів, фторхінолони здатні знижувати високі цитотоксичні концентрації NO в клітинах при патологічних станах і, таким чином, спричиняти позитивний лікувальний ефект.

L-аргінін є єдиним субстратом для синтезу NO всіма формами NOS. Доступність внутрішньоклітинного *L*-аргініну є лімітуючим фактором NO-синтезу і потенційним механізмом контролю регуляторної функції NO, скільки більшість типів клітин не здатні синтезувати *L*-аргінін і потребують

його екзогенного надходження. *L*-аргінін виступає ключовою молекулою у низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які зазнають серйозних змін під час різних патологічних станів [151, 158].

Зміни активностей аргіназної та NOS ензиматичних систем лише вказують на спрямованість дисметаболічних порушень в системі NO-гомеостазу. Проте, біохімічні механізми, що ведуть до змін функціональної активності досліджуваних ензиматичних систем при дії фторхінолонів залишаються не з'ясованими. Тому наступний етап нашого дослідження був присвячений вивченню кінетичних властивостей cNOS та iNOS ізоформ лімфоцитів крові.

З метою вивчення особливостей і механізму роботи NOS- визначали максимальну миттєву швидкість реакції (V_0), максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції (P_{max}) та характеристичний час реакції (τ). Для встановлення цих кінетичних параметрів NOS, досліджували динаміку зменшення NADPH(H^+), що свідчить про синтез NO. Для цього- суспензію лімфоцитів інкубували в стандартному середовищі інкубації, протягом різних проміжків часу (0-30 хв).

Результати досліджень показали, що кінетичні криві утворення NO, у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові, мають тенденцію до насичення. Кінетика утворення NO, за участю cNOS, узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0 – 20 хв: у цьому інтервалі часу- графік залежності утворення NO від періоду інкубації є практично лінійним. Тому, у подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і, відповідно, NO-синтазної реакції- становила 20 хв.

Динаміка і кількість утворення NO, за участю cNOS лімфоцитів крові , при дії фторхінолонів, є суттєво нижчими, ніж в групі контролю. Ці дані корелюють з поколіннями антибіотиків.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах P/t від P , обчислено основні кінетичні характеристики NOS реакції лімфоцитів крові.

Значення кінетичних параметрів для cNOS лімфоцитів крові контрольної групи та при дії фторхінолонів істотно відрізняються між собою. Так, V_0 в контрольній групі складало $92,2 \pm 7,1$ нмоль NADPH(H^+)/хв на 1 мг протеїну. При дії ципрофлоксацину V_0 суттєво знижувалось, у 3,2 раза ($p < 0,001$), при дії левофлоксацину – у 3,4 раза ($p < 0,001$), а при дії моксифлоксацину – у 4,9 раза ($p < 0,001$).

Щодо кінетичних параметрів індукцбельної NO-синтазної реакції, то через її низьку активність в контролі- коректно розрахувати їх не було можливим.

Синтез NO, за участю cNOS при дії фторхінолонів, відбувається повільніше і менш активно, ніж за їх відсутності. Щодо максимальної кількості утвореного продукту реакції, продукowanego в cNO-синтазній реакції, то при дії ципрофлоксацину- його утворювалось в 3,5 менше, ніж у контрольній групі ($p < 0,001$). При дії левофлоксацину – у 3,6 раза менше, а при дії моксифлоксацину – у 3,8 раза менше щодо групи контролю.

При аналізі характеристичного часу реакції, було з'ясовано, що він зростав із $36,1 \pm 4,0$ хв (контроль) до $50,2 \pm 4,3$ хв ($p < 0,05$).

Таким чином, при інтерпретації отриманих кінетичних параметрів, визначених за *L*-аргініном, показано, що за дії фторхінолонів , зростання активності аргінази в лімфоцитах відбувається за рахунок зростання числа обертів ензиму (V_{max} зростає) на фоні зниження спорідненості субстрату до ензиму (K_{L-arg} – зростає). Отримані кінетичні параметри свідчать, що у лімфоцитах крові при дії фторхінолонів інгібується синтез NO за участю cNOS та інгібується гіперпродукція NO, спричинена активацією iNOS, що характерно для патологічних станів. Отже, за умов впливу фторхінолонів на лімфоцити крові , порушується співвідношення NO-синтазного та аргіназного метаболізму *L*-аргініну, що свідчить про дисметаболічні зміни в системі синтезу NO.

Згідно сучасних уявлень, вплив на організм ксенобіотиків, ліків, розвиток патологічних процесів, супроводжуються порушенням механізмів

антиоксидантного захисту клітин [1, 6, 31, 201, 208]. При дії хімічних препаратів, часто ініціюються окиснювальні вільнорадикальні процеси в фосфоліпідах клітинних мембран, що містять поліненасичені жирні кислоти. Інтенсифікація пероксидації ліпідів призводить до накопичення токсичних продуктів, що призводить до зниження резистентності організму [52, 97]. В той же час, буферна ємність антиоксидантної системи- достатньо велика та забезпечується різними складовими. Важливе місце серед АОС клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь, як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-трансфераза), так і в неензиматичних (глутатіон) реакціях АОС [136, 142, 154]. Хоча система глутатіону є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в реакції організму на дію тих, чи інших антибіотиків або розвиток патологічних станів. У зв'язку з тим ,аналіз функціонального стану системи глутатіону при дії антисептиків та антибіотиків фторхінолонового ряду, дозволить виявити її роль в механізмі дії даних препаратів.

Інтенсифікація пероксидації ліпідів призводить до накопичення токсичних продуктів, що супроводжується зниженням резистентності організму [103, 115, 118, 170, 201]. В той же час, буферна ємність антиоксидантної системи достатньо велика та забезпечується різними складовими. Важливе місце серед АОС клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь, як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-трансфераза), так і в неензиматичних (глутатіон) реакціях АОС [136, 142, 154]. Хоча система глутатіону є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в розвитку патологічних станів, запальних процесах, дії антисептиків та антибіотиків на організм. У зв'язку з тим, аналіз функціонального стану системи глутатіону та пероксидації ліпідів, дозволить детальніше з'ясувати механізм дії антисептика декаметоксину.

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в лімфоцитах периферичної крові, при дії декаметоксину.

Показано незначне інгібування процесів ПОЛ, за дії різних концентрацій декаметоксину, яку оцінювали за визначенням концентрації малонового діальдегіду, який є вторинним продуктом пероксидації ліпідів.

Так, у контролі концентрація МДА у лімфоцитах крові- складає $62,3 \pm 4,6$ мкмоль/мг протеїну. При дії різних концентрацій декаметоксину (10^{-5} – 10^{-2} М) ця величина дещо знижується, до $55,1 \pm 4,3$ мкмоль/мг протеїну ($p > 0,001$). Таким чином, у лімфоцитах крові достовірних змін в процесах ПОЛ при дії декаметоксину не виявлено, хоча спостерігається тенденція до їх зниження.

На відміну від декаметоксину, фторхінолони мали протилежний ефект на процеси ПОЛ. Всі досліджувані нами фторхінолони дозозалежно активували процеси ПОЛ.

Одночасно з незначним зниженням процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни в активності ензимів системи глутатіону. Так, показано, що в контролі глутатіонпероксидазна активність лімфоцитів складає $154,2 \pm 13,4$ нмоль GSH/хв·мг протеїну.

За дії декаметоксину, ця активність дозозалежно зростає і сягає $(181,2 \pm 13,3)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$). Однак, концентрація відновленого глутатіону при дії декаметоксину практично не змінювалась і знаходилась в межах $(17,2-18,4)$ нмоль GSH/мг протеїну. Фторхінолони також дозозалежно стимулюють глутатіонпероксидазну активність.

Щодо активності глутатіонредуктази, то в контролі вона складала $(51,7 \pm 4,2)$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну. При дії декаметоксину, в концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М, ця активність дозозалежно зростала до $(62,3 \pm 5,4)$ нмоль NADPH/хв на 1мг протеїну, тобто в 1,2 раза щодо групи контролю ($p < 0,05$).

Глутатіон-S трансферазна активність в контролі складала $(12,2 \pm 9,2)$ нмоль GSH/хв на 1 мг мг протеїну. Додавання в інкубаційне середовище декаметоксину в концентраціях 10^{-5} – 10^{-2} М дозозалежно активувало цей

ензим, активність якого зростала до $(156,6 \pm 12,4)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну, тобто в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Таким чином, показано, що антисептик декаметоксин суттєво впливає на регуляторні механізми клітини, зокрема лімфоцити крові. Активує ензими глутатіонової антиоксидантної системи.

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в лімфоцитах периферичної крові при дії фторхінолонів II – IV поколінь. У всіх випадках- показано активацію процесів ПОЛ, за визначенням концентрації малонового діальдегіду, який є вторинним продуктом пероксидації ліпідів. Так, у лімфоцитах крові контрольної групи концентрація МДА дорівнює $(4,1 \pm 0,4)$ мкмоль/л. При дії ципрофлоксацину (II покоління) процеси ПОЛ інтенсифікуються в 1,7 раза щодо показників у групі контролю, при цьому концентрація МДА сягає $(6,6 \pm 0,5)$ мкмоль/л ($p < 0,001$).

За дії на лімфоцити левофлоксацину (III покоління) -процеси ПОЛ ще більше активуються, концентрація МДА зростає до $(7,4 \pm 0,6)$ мкмоль/л, тобто в 1,8 раза щодо контрольних значень ($p < 0,001$). Подібна ситуація спостерігається і при визначенні концентрації МДА у лімфоцитах крові при дії моксифлоксацину (IV покоління). Моксифлоксацин призводить до зростання МДА в 1,9 раза, до $(7,9 \pm 0,7)$ мкмоль/л ($p < 0,001$). Можна бачити пряму залежність активації процесів ПОЛ від покоління антибіотиків у ряді моксифлоксацин > левофлоксацин > ципрофлоксацин.

Таким чином, при дії фторхінолонів, процеси ПОЛ в лімфоцитах крові суттєво інтенсифікуються – в 1,7–1,9 раза ($p < 0,001$).

Одночасно з інтенсифікацією процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни і в активності ензимів системи глутатіону.

Так, показано, що в контролі концентрація відновленого глутатіону в лімфоцитах крові складає $(18,1 \pm 1,7)$ нмоль/мг протеїну. При дії на лімфоцити, окремо, ципрофлоксацину, левофлоксацину чи моксифлоксацину, достовірних змін концентрації глутатіону не виявлено, вона коливалась в межах $(17,9 \pm 1,6 - 18,2 \pm 1,7)$ нмоль/мг протеїну.

Однак, активність глутатіонпероксидази лімфоцитів, при дії ципрофлоксацину, зростала з $(154,2 \pm 13,4)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну (контроль) до $(177,3 \pm 13,7)$ ($p > 0,05$), при дії левофлоксацину – до $(189,3 \pm 15,7)$ ($p > 0,05$), а при дії моксифлоксацину – до $(199,3 \pm 16,7)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$). Тобто, достовірне зростання активності глутатіонпероксидази відбувається тільки при дії моксифлоксацину- в 1,3 раза.

Щодо активності глутатіонредуктази, то в лімфоцитах, в контролі, вона складала $(51,7 \pm 4,2)$ нмоль NADPH/ хв на 1 мг протеїну. При дії ципрофлоксацину -знижувалась до $(40,7 \pm 4,2)$ ($p < 0,05$), левофлоксацину – до $(40,1 \pm 4,2)$ ($p < 0,05$), а при дії моксифлоксацину – до $(38,9 \pm 4,1)$ нмоль NADPH/хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$).

Активність глутатіон-S трансферази в лімфоцитах в контролі складала $(112,2 \pm 9,2)$ нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну. При дії ципрофлоксацину вона зростає в 2,3 ($p < 0,001$), левофлоксацину – в 3,1 ($p < 0,001$), а моксифлоксацину – в 3,8 раза ($p < 0,001$).

Таким чином, дані антибіотики суттєво активують процеси ПОЛ у лімфоцитах та одночасно активують основні ензими антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидазу та глутатіонтрансферазу. Щодо активності глутатіонредуктази, що відновлює окиснений глутатіон, то її активність знижувалась. Активацію ензимів ГП та ГТ, за відсутності ендогенного синтезу відновленого глутатіону, можна пояснити тим, що дослідження проводились *in vitro* при оптимальних концентраціях субстратів у середовищах інкубації. Також, ймовірно, існують певні відмінності в механізмах дії різних фторхінолонів і в особливостях реакції на них різних органів і тканин.

Отримані результати погоджуються з деякими літературними даними, де показано, що фторхінолони призводять до зростання концентрації МДА, а також активують глутатіонпероксидазу, супероксиддисмутазу та каталазу [102]. Також було показано, що моксифлоксацин призводить до зростання концентрації МДА в гепатоцитах, однак, одночасно знижує активності

каталази, супероксиддисмутази та глутатіонтрансферази [130]. З іншого боку, було показано, що фторхінолон гатифлоксацин-дозозалежно призводить до зростання концентрації малонового діальдегіду й одночасного зниження активності супероксиддисмутази та рівня глутатіону в крові, зростання активностей каталази, глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази. Інший фторхінолон-енрофлоксацин-не спричиняв оксидативний стрес крові, не впливав на активність ензимів глутатіонової антиоксидантної системи [186].

На підставі отриманих результатів досліджень та аналізу літературних джерел, нами запропоновано узагальнюючу схему, яка ілюструє мікробіцидні ефекти ДКМ та антибіотиків фторхінолонового ряду і біохімічні ефекти, вказаних сполук, у лімфоцитах крові (рис. 6.1).

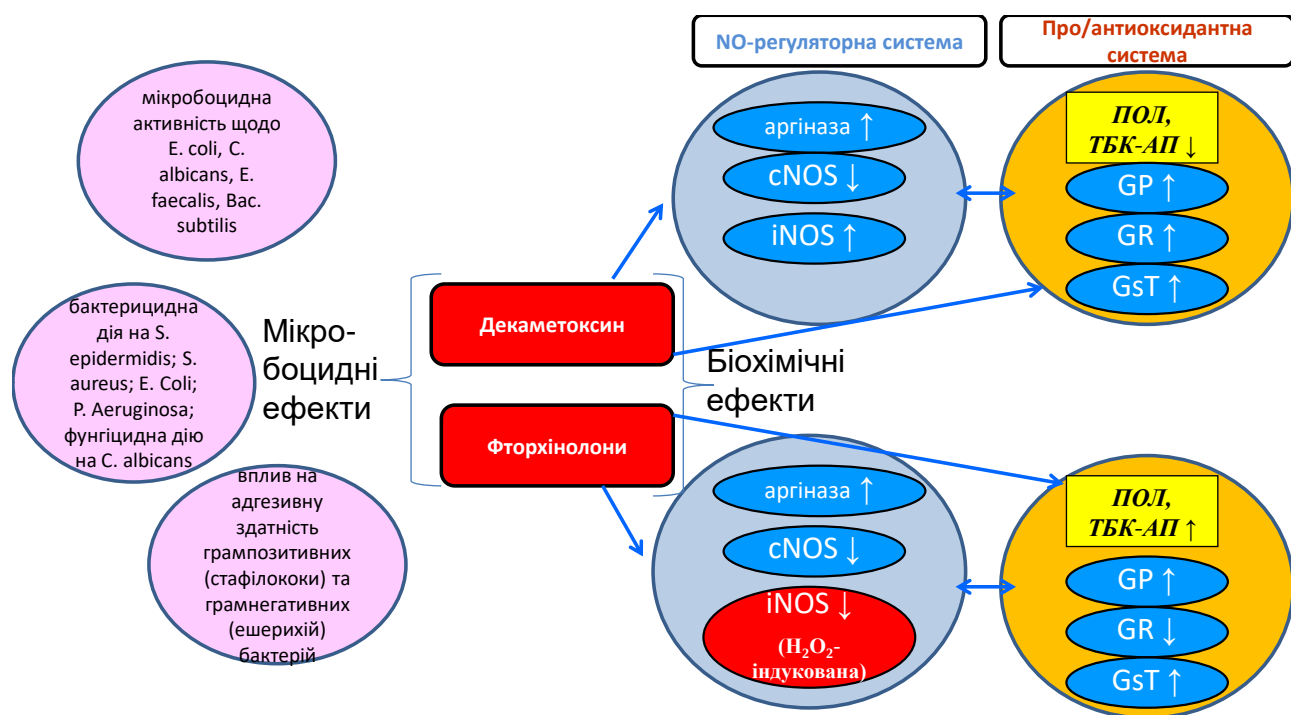


Рис. 6.1. Узагальнююча схема мікробіцидних і біохімічних ефектів декаметоксину та антибіотиків фторхінолонового ряду

Мікробіцидні ефекти декаметоксину і фторхінолонів є схожими та проявляються у мікробіцидній активності щодо музейних штамів *E. coli*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *Bac. subtilis*, *S. aureus*. Показано їх високу бактерицидну

дію на штами *S. epidermidis*; *S. aureus*; *E. coli*; *P. Aeruginosa*, фунгіцидну дію на *C. albicans*. Встановлено, що ДКМ та ДС в різних бактеріостатичних і бактеріоцидних концентраціях суттєво впливають на адгезивну здатність грампозитивних (стафілококи) та грамнегативних (ешерихій) бактерій.

Біохімічні ефекти декаметоксину і фторхінолонів, що реалізуються в лімфоцитах крові є дещо відмінними. Із запропонованої схеми видно, що дія ДМ проявляється у порушенні NO-регуляторної системи. Так, за дії декаметоксину співвідношення аргіназа/NO-синтаза збільшується в бік NO-гіперпродукції, головним чином, внаслідок активації Ca^{2+} -незалежної індукцйбельної ізоформи NOS. Виявлено активацію ензимів глутатіонової ланки антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіон-S трансферази) та тенденцію до пригнічення процесів пероксидного окиснення ліпідів. Зростання активностей ензимів глутатіонової антиоксидантної системи розглядається як компенсаторний механізм, що запобігає подальшому розвитку оксидативного стресу та нейтралізує вільні радикали.

Натомість, біохімічні ефекти фторхінолонів, проявляються у їх здатності активувати лише неокисний (аргіназний) шлях метаболізму L-аргініну. При цьому виявлено їх здатність до пригнічення H_2O_2 -індукованої активності iNOS. Разом з тим активуються вільнорадикальні процеси, що підтверджується зростанням вмісту ТБК-активних продуктів у лімфоцитах крові. На тлі інтенсифікації вільнорадикальних процесів- виявлено компенсаторне зростання активностей ензимів глутатіонової ланки антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидази та глутатіон-S трансферази) з одночасними пригніченням активності глутатіонредуктази.

Отже, за дії фторхінолонів, в лімфоцитах крові активуються вільнорадикальні процеси, внаслідок чого розвивається стрес. Останній тісно пов'язаний із нітразивним стресом, зумовленим гіперпродукцією NO та утворенням цитотоксичного пероксинітриду. Зростання активності аргінази, за дії фторхінолонів, слід розглядати як компенсаторний механізм,

спрямований на обмеження біодоступності *L*-аргініну (спільного субстрату для аргінази та NOS).

Таким чином, порушення функціональної активності NO-регуляторної системи тісно пов'язане з про-/антоксидантною рівновагою, відтак, зміни активності однієї з систем ведуть до дисбалансу іншої, між якими існує тісний функціональний зв'язок.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання щодо мікробіологічного дослідження антимікробних властивостей лікарських антимікробних препаратів- декамтоксину та фторхінолонів і з'ясування особливостей функціонування аргіназо-NO-синтазної та про-/антиоксидантної систем лімфоцитів крові при дії цих препаратів. Запропоновано модель, що описує причинно-наслідкові зв'язки між гомеостазом оксиду азоту та системою глутатіону.

1. Показано, що обидва препарати декаметоксин і декасан мікробіцидно діють на стафілококи, ентерококи, кишкову паличку та *Candida albicans*, проте, патентований взірець декаметоксину, за мікробіцидною дією, переважає декасан. Доведено, що у стафілококів і *C. Albicans*- повільно формується стійкість *in vitro* до декаметоксину та декасану, яка після 30 пасажів збільшується у 16-64 рази. В процесі формування резистентності у стафілококів, *C. albicans* має місце значне пригнічення їх біологічних властивостей.
2. Антисептичні препарати декаметоксин і декасан ефективно діють на адгезини стафілококів та ешерихій. Доведено, що ДКМ і ДС, в досліджуваних мінімальних бактеріостатистичних і мінімальних бактеріоцидних концентраціях, забезпечують потужну дію на адгезини бактерій, що може спричиняти високий профілактичний і лікувальний ефекти в процесі застосування цих лікарських антимікробних засобів.
3. Вперше отримані прогностичні дані щодо динаміки чутливості до фторхінолонів клінічних штамів *S. aureus*, які виявляли у хворих із гнійно-запальними ускладненнями після важких опіків У клінічних штамів золотистого стафілококу, прогнозована чутливість до ципрофлоксацину, має тенденцію до зниження, а до левофлоксацину - зростання. Високою є чутливість *S. aureus* до моксифлоксацину. Вперше виявлено, що у лімфоцитах крові, декаметоксин у концентраціях,

дозозалежно призводить до зростання аргіназної активності щодо контрольних значень. При дії фторхінолонів на лімфоцити крові аргіназна активність зростає в ряді: контроль → ципрофлоксацин → левофлоксацин → моксифлоксацин в 1,4–1,9 рази, що, перш за все, обумовлено збільшенням спорідненості ензиму до субстрату та зростанням максимальної швидкості реакції.

4. Декаметоксин у лімфоцитах крові дозозалежно інгібує активність конститутивної ізоформи NO-синтази із одночасною активацією індукцйбельної ізоформи NO-синтази.
5. Отримані кінетичні параметри свідчать, що у лімфоцитах крові при дії фторхінолонів інгібується синтез NO, за участі конститутивної ізоформи NO-синтази та інгібується гіперпродукція NO, спричинена активацією індукцйбельної ізоформи NO-синтази, що характерно для патологічних станів. За умов впливу фторхінолонів на лімфоцити крові, порушується співвідношення NO-синтазного та аргіназного метаболізму *L*-аргініну, що свідчить про дисметаболичні зміни в системі синтезу NO.
6. У лімфоцитах крові- достовірних змін в процесах пероксидації ліпідів, при дії декаметоксину, не виявлено. Фторхінолони дозозалежно активують процеси ПОЛ і у прямій залежності від покоління антибіотиків: моксифлоксацин > левофлоксацин > ципрофлоксацин > контроль.
7. Декаметоксин активує ензими глутатіонової антиоксидантної системи в лімфоцитах крові (глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу та глутатіон-S трансферазу) та не впливає на концентрацію відновленого глутатіону.
8. Всі антибіотики фторхінолонового ряду активують процеси пероксидації ліпідів у лімфоцитах крові та одночасно активують основні ензими антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидазу та

глутатіонтрансферазу. Щодо активності глутатіонредуктази, то її активність знижується.

9. Продемонстровані взаємозв'язки між бактеріоцидною та бактеріостатичною дією декаметоксину і фторхінолонів, їх впливом на регуляторні системи – аргіназа/NO-синтазу та антиоксидантну – системи клітин макроорганізму

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бєленічев ІФ, Левицький ЕЛ, Губський ЮІ, Коваленко СІ, Марченко ОМ. Антиоксидантна система захисту організму. Сучасні Пробл. Токсикол. 2002;3:8-19.
2. Болдырев АА, Кяйвярйянен ЕИ, Илюха ВА. Биомембранология. Петрозаводск: Из-во КарНЦ РАН; 2006. 226 с.
3. Бол П, Стахлман Р, Кубін Р. Профіль безпечності перорального та внутрішньовенного моксифлоксацину: кумулятивні дані з клінічних і постмаркетингових досліджень. Клиническая Антибиотикотерапия. 2005;5:42-6.
4. Борис ЕН, Суменко ВВ, Онищик ЛН, Малышева ИВ. Применение фторхинолонов IV поколения в комплексной терапии воспалительных заболеваний органов малого таза. Здоровье женщины. 2012;4(70):86-92.
5. Булавин ДВ, Карпищенко АИ, Губанов АИ. Глутатион-S-Трансфераза Р1-1 в нормальной и опухолевой тканях легкого: свойства, функции и возможные механизмы регуляции активности. Биохимия. 1996;61(6):1015-27.
6. Владимиров ЮА. Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журн. 2000;6(12):13-19.
7. Володарський ЄТ, Кошєєва ЛО. Статистична обробка даних: навчальний посібник. Київ: НАУ. 2008. 308 с.
8. Гжегоцький МР, Заячківська ОС. Система крові. Фізіологічні та клінічні основи. Львів: Світ; 2001. 173 с.
9. Гончар ОО, Задерей НВ, Береза Б.М. та ін. Дослідження формування стійкості мікроорганізмів до антисептичних препаратів. Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу. Матеріали щорічної 11 наук.-практ. конф. 2014 квіт. 15-16; Львів; 2014, с. 81-3.
10. Гончар ОО, Коваленко ІВ. Оцінка формування резистентності у мікроорганізмів до антибіотиків і антисептиків. Матеріали VI міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених. 2015 трав. 15; Вінниця;

2015, с. 38.

11. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Яцула ОВ, Буркот ВМ. Дослідження дії декаметоксину та його лікарських форм на адгезію бактерій. Світ медицини та біології. 2015;4(52):103-6.
12. Гончар ОО, Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Буркот ВМ. Антимікробні властивості генериків декаметоксину. Медична та клінічна хімія. 2015;4(61):43-6.
13. Гончар ОО, Назарчук ОА, Коваленко ІВ, Яцула ОВ. Вивчення антимікробних властивостей лікарських антисептичних препаратів, що містять декаметоксин. Український біофармацевтичний журнал. 2016;1(42):74-7.
14. Гридіна ТЛ, Палій ГК, Лозицький ВП, Федчук АС. Результати дослідження деяких механізмів протівірусної дії декаметоксину та етонію. Biomed. Biosoc. Anthropol. 2008;(11):43-5
15. Давтян ТК Аванесян ЛА. О взаимоотношении иммунного и адаптивного ответов. Успехи соврем. биол. 2001;121(3):275-86.
16. Дагбашян СС. Изменение структурно-функциональной организации мембран лимфоцитов крови при лимфогранулематозе. Медицинский Вестник Эрбуні. 2007;3(31):28-31.
17. Данилович ЮВ. Взаимосвязь образования NO и H₂O₂ и их роль в регуляции ионного гомеостаза клеток. Укр. біохім. Журн. 2001;73(3):5-21.
18. Декасан. Фармакопейна стаття ФС 42U-249-975-00. Державний департамент по контролю за якістю, безпекою і виробництвом лікарських засобів та виробів медичного призначення Міністерства охорони здоров'я України; 2000. 6 с.
19. Державний реєстр лікарських засобів України. Міністерство охорони здоров'я України, Держ. експертний центр МОЗ. [Інтернет]. [цитовано 2017 січ. 12]. Доступно на: <http://www.drlz.kiev.ua>.
20. Долгих ВТ. Основы иммунопатологии. Москва: Медицинская книга; 2001. 229 с.

21. Дудікова ДМ, Дронов МЛ, Вринчану НА. Новые антибиотики хинолонового ряда: перспективы применения в клинической практике. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2015;1(42):35-42.
22. Жорняк ОІ, Стукан ОК. Вплив антисептичних препаратів на адгезивні властивості мікроорганізмів. Буковинський медичний вісник. 2010;14(4):122-24.
23. Жорняк ОІ, Стукан ОК, Сухляк ВВ. Дія антисептичних засобів на патогенні механізми бактерій. Annals of Mechnikov Institute. 2010;4:53-8.
24. Жорняк ОІ, Сухляк ВВ, Палій ІК. Патологоморфологічне дослідження внутрішніх органів лабораторних тварин після введення антисептичного препарату септефрил. Annals of Mechnikov Institute. 2011;1:48-53.
25. Зайцев АА, Синопальников АИ. Респираторные фторхинолоны в терапии инфекций дыхательных путей. Русский мед. журн [Интернет]. [цитовано 2010 груд 29];(30).
26. Зарицький ОО, Коваленко ІВ. Дослідження антисептичних препаратів у пацієнтів з інфекційними ускладненнями після травми. Матеріали міжнародної наукової конференції молодих вчених. Перший крок в науку; 2017 квіт. 26-28; Вінниця; 2017, с. 35.
27. Зінченко ДА, Заболотна ДД. Застосування антибактеріальних препаратів із групи фторхінолонів у терапії пацієнтів із загостреннями хронічних синуситів. Клиническая антибиотикотерапия. 2005;3:1-2.
28. Іваночко РБ, Білецька ЛП, Склярів ОЯ. Зміни показників системи L-аргінін–нітрогену оксид–аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу. Експеримент. та клін. фізіол. і біохімія. 2014;1:66-70.
29. Інструкція для медичного застосування препарату ДЕКАСАН [цитовано 2017 Лист. 03]. Доступно на: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=8844>
30. Камышников ВС. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. 3-е изд. Москва: МЕДпрессинформ; 2009. 896 с.

31. Капелько ВИ. Активные формы кислорода, антиоксиданты и профилактика заболеваний сердца. Русский мед. журн. 2003;21:1185-90.
32. Каримов ХЯ, Иноятова ФХ, Мухамедова МТ. Изменения некоторых показателей синтеза окиси азота в ранние периоды развития гепатоканцерогенеза. Лікарська справа. 2002;(7):90-2.
33. Кишко ТО, Шандренко СГ, Дмитренко НП. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота. Журн. АМН України. 2008;14(1):150-8.
34. Коваленко ІВ, Воробець ЗД. Вплив антибіотиків фторхінолонового ряду на активність аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові. Сучасні аспекти збереження здоров'я людини. XIII Міжнародна міждисциплінарна наук.-практ. конф.; 2020 квіт. 3-4; Ужгород; 2020, с. 286-91.
35. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Мельник ОВ, Корчинська ОС, Корнійчук ОП. Кінетичний аналіз активності ензимів NO-синтазної системи лімфоцитів крові за дії антибіотиків фторхінолонового ряду. Medical and Clinical Chemistry. 2019;3(80):96-7.
36. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Воробець ЗД. Вплив декаметоксину на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної та антиоксидантної систем лімфоцитів крові.
37. Коваленко ІВ, Онуфрович ОК, Воробець ЗД. Вплив декаметоксину на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної та антиоксидантної систем лімфоцитів крові. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю. Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження, присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету; 2020 трав. 19-20; Івано-Франківськ; 2020, с. 126-7.
38. Ковальчук ВП, Кондратюк ВМ, Гадлевська ДІ. Доклінічне вивчення ефективності нових адгезивних лікарських засобів для протимікробного захисту полімерних виробів медичного призначення. Ліки – людині: Сучасні

проблеми створення, дослідження та апробації лікарських засобів : Матеріали XXVI наук.-практ. конф. з міжнародною участю; 2009 бер. 12; Харків; 2009, с. 47.

39. Ковальчук ВП, Гуменюк МІ, Біктіміров ВВ, Желіба МД, Сафронов КМ. Результати експериментального і клінічного дослідження ефективності антисептичного препарату декасану. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2002;2:292-4.

40. Козлов РС, Голуб АВ. Респираторные фторхинолоны в амбулаторной клинической практике. Медицинский совет. 2015;11:114-19.

41. Комаревцев ВН, Гонцов Ю.В. Ефективність і безпечність ципрофлоксацину в терапії урогенітальних інфекцій. Клиническая антибиотикотерапия. 2005;5:47-8.

42. Комісаренко СВ. Молекулярні механізми активації лімфоцитів. Укр. біохім. журн. 2002;74(4):8.

43. Коваленко ВН, редактор. Компендиум 2015 – лекарственные препараты. Київ: МОРИОН; 2015. 2320 с.

44. Коноварт ОВ, Воробець ЗД. Вплив омепразолу на активність ферментів глутатіонової антиоксидантної системи лімфоцитів периферичної крові. Буковинський медичний вісник. 2004;9(2):112-14.

45. Костерин СА, Бурчинская НФ. Метод определения кинетических характеристик Ca^{2+} -транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц. Укр. біохім. журн. 1987;59(2):66-9.

46. Коцюруба АВ, Коркач ЮП, Таланов СО, Базілюк ОВ, Степаненко ЛГ, Сагач ВФ. Вікові особливості змін аргіназо-NO-синтазної системи в серці щурів в умовах адаптації до тривалих фізичних 128 навантажень плаванням. Фізіол. журн. 2012;58(1):27-35.

47. Кучма ІЮ, Климов ОИ, Драч МИ. Влияние декаметоксина на состояние мембран эукариотов. Анали Мечніковського інституту. 2003;(4/5):83-4.

48. Лакин ГФ. Биометрия. 4-е изд. Москва: Высшая школа; 1990. 352 с.

49. Лаповець Л, Луцик Б. Лабораторна імунологія. Київ: Арал; 2004. 173с.

50. Лебедева ВА, Пушкакрев СВ, Сафронов ИД, Трунов А.Н. Выраженность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантный потенциал у больных с распространенным раком яичников в динамике полихимиотерапии. Сибирский онкол. журн. 2007;2 (22):42-5.
51. Личковський ЕІ, Свердан ПЛ. Вища математика. Теорія наукових досліджень у фармації і медицині. Київ: Знання; 2012. 476 с.
52. Луговський СП. Зміни активності ферментного спектра лімфоцитів периферійної крові при свинцевій інтоксикації (цитохімічне дослідження). Лабор. діагностика. 2002;(2):29-32.
53. Мавзютов АР, Бондаренко ВМ, Жеребцова НЮ. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи. Журнал микробиологии. 2007;(1):89-97.
54. Макаров ВВ. Применение антисептика «Декасан» в лечении острых абсцессов легких. Проблеми сучасної торакальної хірургії : труди та тези доповідей науково-практичної конференції, м. Сімеїз – Кривий Ріг; 2005 квіт. 26-27; Кривий Ріг; 2005. с. 149-53.
55. Малий ВП, Палій ГК, Палій ДВ, Волянський АЮ. Обґрунтування застосування Декасану® при сальмонельозній інфекції. Інфекційні хвороби. 2010;(3):66-9.
56. Машковский МД. Лекарственные средства. Пособие для врачей. 15 издание. – Москва:Новая волна; 2007. 953 с.
57. Махуніна ЕБ, Лямина НП, Долотовская ПВ. Роль оксида азота и кислородных свободных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии. Кардиология. 2002;(11):73-84.
58. Мироненко ЛГ, Перетятко ОГ, Великий ІС. Адгезивні властивості ентерококів, ізольованих від хворих на нейрохірургічну патологію. Вісник проблем біології і медицини. 2012;1(96):180-3.
59. Моин ВМ. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лаб. дело. 1986;(12):724-7.
60. Навашин СМ, Сазыкин ЮО. Антибиотики: новые механизмы передачи

резистентности. Антибиотики и химиотерапия. 1998;43(6):3-6.

61. Назарчук ОА, Гончар ОО, Яцула ОВ. Вивчення антимікробних властивостей лікарських антисептичних препаратів, що містять декаметоксин. Укр. біофармац. журнал. 2016;(1):74-7.

62. Назарчук ОА, Коваленко ІВ. Аналіз ефективності сучасних антибіотиків, антисептиків щодо збудників госпітальної інфекції. Матеріали щорічної 12-ої науково-практичної конференції з міжнародною участю приуроченою до дня науки, 75-річчю інституту, 105-річчю Г.С. Мосінга; 2015 трав. 21-22; Львів; 2015, с. 113-14.

63. Назарчук ОА, Палій ДВ, Коваленко ІВ, Гончар ОО, Яцула ОВ. Мікробіологічна характеристика резистентності мікроорганізмів до антисептичних препаратів. Вісник проблем біології і медицини. 2015;125(4):282-6.

64. Назарчук ОА, Палій ДВ, Назарчук ГГ. Вивчення резистентності штамів золотистого стафілококу до протимікробних засобів. Аналіз Мечниковського інституту. 2012;(4):133-9.

65. Некрасова ЛС, Свита ВМ, Глушкевич ТГ, Томчук ВВ, Жеребко НМ, Покас ОВ. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки. Київ: МОЗ України; 2007. 74 с.

66. Палій ГК, Назарчук ОА, Бобир ВВ, Гончар ОО, Гридін ТЯ, Палій ДВ, та ін. Оцінка антибактеріальних властивостей сучасних антисептиків. Мікробіологія і біотехнологія. 2015;4(32):67-74.

67. Палій ГК, Назарчук ОА, Нагайчук ВІ, Осадчук НІ, Палій ДВ, Коваленко ІВ. Аналітичне прогнозування чутливості стафілококу до фторхінолонів. Світ медицини та біології. 2015;3(51):104-7.

68. Палій ГК, Назарчук ОА, Палій ВГ, Кулаков ОІ, Палій ДВ, Назарчук ГГ, та ін. Вивчення протимікробних властивостей антимікробного засобу палісепт плюс. Буковинський медичний вісник. 2014;18(3):114-18.

69. Палій ГК, Назарчук ОА, Палій ДВ, Буркот ВМ, Кравчук ПО. Дослідження протимікробних властивостей антимікробного засобу з

декаметоксином. Світ медицини та біології. 2014;2(44):146-8.

70. Палій ГК, Назарчук ОА, Гончар ОО, Коваленко ІВ, Яцула ОВ. Дослідження фізико-хімічних, протимікробних властивостей лікарського препарату «Декаметоксин». Медична та клінічна хімія. 2016;18(1):36-44.

71. Палій ГК, Назарчук ОА, Кулаков ОІ, Палій ВГ, Назарчук СА, Палій ДВ, та ін. Обґрунтування застосування антимікробних перев'язувальних матеріалів у хірургії. Медичні перспективи. 2014;19(2):152-8.

72. Палій ВГ, Назарчук ОА, Палій ДВ, Яковець КІ. Обґрунтування медичного застосування антимікробних засобів, що містять Декаметоксин®. Буковинський медичний вісник. 2017;1(81):100-5.

73. Палій ГК, Назарчук ОА, Бобир ВВ, Гончар ОО, Гридїна ТЛ, Палій ДВ, та ін. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків. Мікробіологія і біотехнологія. 2015;(4):67-74.

74. Палій ГК. Антимікробний лікарський препарат декасан: стратегія і тактика застосування для профілактики та лікування гнійно-запальних захворювань. Український хіміотерапевтичний журнал. 2004;1-2(19):83-5.

75. Палій ДВ, Стукан ОК. Дослідження антисептиків в умовах формування резистентності у мікроорганізмів. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2014;(22):54-7.

76. Палій ГК, Нечитайло МЄ, Ковальчук ВП, Крижанівська АВ, Палій ДВ. Порівняльна характеристика антисептичної ефективності декаметоксину та фурациліну. Здоров'я України. 2010;(22):56-7.

77. Палій ДВ, Яцула ОВ, Дудар АО, Коваленко ІВ. Вивчення антимікробних препаратів на адгезивні властивості бактерій. Вісник проблем біології і медицини. 2016;2(128):174-7.

78. Палій ВГ, Сухляк ВВ, Палій ДВ, Гончар ОО, Крижановська АВ, Береза БМ, та ін. Протимікробна дія антисептичних препаратів, антибіотиків на збудники запальних захворювань. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2014;22:44-6.

79. Панчук СІ, Гуменюк МІ. Антимікробна активність декаметоксину щодо

бактеріальних збудників інфекційного загострення бронхіальної астми. Медицина транспорту України. 2014;(1):37-42.

80. Перетятко ЮВ, Сибірна НО. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення. Укр. біохім. журн. 2009;81(2):40-8.

81. Підковка НО, Воробець ЗД, Зіменковський АБ. Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини. Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. 2002;7(1):38-41.

82. Посохова КА, Вікторов ОП, Мальцев ВІ, Шараєва МЛ. Фторхінолони (основи ефективного і безпечного застосування). Новости медицины и фармации. 2002;(2):14-23.

83. Тимирбулатов СА, Селезнев ЕИ. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. Лаб. дело. 1988;(4):209-11.

84. Тузеева АЮ, Долгова ДР, Абакумова ТВ, Сенина ДН. Изучение про- и антиоксидантного статуса эритроцитов при прогрессировании экспериментального рака яичников. Фундаментальные исследования. 2014;(12):145-9.

85. Фафула РВ, Єфремова УП, Личковська НЕ, Мельник ОП, Воробець ЗД, Кулачковський ОР. Методологічний підхід до вивчення ензиматичного спектру лімфоцитів при патологічних станах з використанням детергента сапоніну (ультраструктурне дослідження). Вісник проблем біології та медицини. 2012;4(96):163-6.

86. Фомин ПД, Лисов АИ, Козлов СН. Применение антисептика декасан при нагноительных процессах в мягких тканях. Ліки України. 2006;(11):74-5.

87. Фомин ПД, Лисов АИ, Козлов СН, Михальчишин СН. Применение антисептика декасана в неотложной абдоминальной хирургии. Клінічна Хірургія. 2009;(11-12):98-100.

88. Фторхінолони [Інтернет]. Київ: Моріон; 2019. Доступно на: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/444/ftorxinol>.

89. Фукузова К, Когуре К, Морита М, и др. Увеличение образования оксида азота и супероксида под действием сукцината и токоферола, его способность вызывать апоптоз и противораковые свойства. Биохимия. 2004;69(1):64-73.
90. Хаджибаев АМ, Асомов ХХ, Рискиев УР, Мухамеджанова НН, Сигалов ДО. Программированная санация брюшной полости при перетоните. Український хіміотерапевтичний журнал. 2012;3(26):244-6.
91. Харкевич ДА. Фармакология: учебник. 10-е изд. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 752 с.
92. Шугалей ВС, Козина АС. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду. Физиол. журн. СССР. 1977;(8). 1199-202.
93. Aldred K, Rtrns R, Osheroff N. Mechanism of quinolones action and resistant. Biochemistry. 2014;53:1565-74.
94. Almakaeva LG, Begunova NV, Naumenok LG, Dolya VG, Almakaev M.S. Development of composition of infusion medication on basis of moxifloxacin. Ann. Mechnikov Inst. 2015;2:70-3
95. Ambulkar PS, Ghosh SK, Indole IV, Pal AK. Genotoxic and cytotoxic effects of antibacterial drug, ciprofloxacin, on human lymphocytes in vitro. Nepal. Med. Col. J. 2009;11(3):147-151.
96. Anttila MA, Voutilainen K, Merivalo S, Saarikoski S, Kosma, VM. Prognostic significance of iNOS in epithelial ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 2007;(105):97-103.
97. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2014;36:1-31.
98. Aziz HA, Moustafa GA, Abbas SH, Hauk G, Krishna VS, Sriram D et al. New fluoroquinolones/nitric oxide donor hybrids: design, synthesis and antitubercular activity. Medical Chemistry Research. 2019;28:1272-83.
99. Bamias A, Koutsoukou V, Terpos E, Tsiatas M, Liakos C, Tsitsilonis OE, et al. Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T

- cells with VEGF and TNF α in as cites from advanced ovarian cancer: association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol. Oncol.* 2008;108(2):421-7.
100. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2003;6(2):223-8.
 101. Barksdale AR, Bernard AC, Maley ME, Gellin GL, Kearney PA, Boulanger BR, et al. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. *Surgery.* 2004. 135:527-35.
 102. Beberok A, Wrzesnik D, Otreba M, Miliński M, Rok J, Buszman E. Effect of norfloxacin and moxifloxacin on melanin synthesis and antioxidant enzymes activity in normal human melanocytes. *Molec. Cell. Biochem.* 2014;401(1-2):47-52.
 103. Beltran BA, Orsi E, Clementi Moncada S. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *J. Pharmacol.* 2000;129(5):953-60.
 104. Blachier F, Mignon A, Soubrane O. Polyamines inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in rat liver cytosol. *Nitric oxide: biology and chemistry.* 2007;1(3):268-72.
 105. Blachier F, Davila AM, Benamouzig R. Channeling of arginase in NO and polyamine pathways in colonocytes and consequences. *Frontiers in Bioscience Landmark Ed.* 2011;16:1331-43.
 106. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol. Biol.* 2011;677:375-93.
 107. Bolin A, Guerra B, Nascimento S, Otton R. Changes of lymphocyte oxidant/antioxidant parameters after carbonyl and antioxidant exposure. *Immunopharmacology.* 2012;14(4):690-7.
 108. Bonnefous C, Payne JE, Roppe J, Zhuang H, Chen X, Symons KT, et al. Discovery of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor development candidate KD₇₃₃₂, part 1: Identification of a novel, potent, and selective series of quinolinone iNOS dimerization inhibitors that are orally active in rodent pain models. *J. Med. Chem.* 2009;52(9):3047-62.
 109. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human

- blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968;21(97):77-89.
110. Broholm H, Brandstrup O, Lauritzen M. Nitric oxide synthase expression of oligodendrogliomas. *Clin. Neuropathol.* 2001;20(6):233-38.
111. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanollo P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* 2003;24(6):302-6.
112. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience.* 2009;14:1-18.
113. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr. Pharm. Des.* 2011;17(35):3905-32.
114. Campos CP. Prophylaxis with levofloxacin: bacterial infections and antimicrobial resistance in hematological malignancies. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2014;36(1):15-22.
115. Ceylan E, Aksoy N, Gencer M, Vural H, Keles H, Selek S. Evaluation of oxidative-antioxidative status and the L-arginine-nitric oxide pathway in asthmatic patients. *Respir. Med.* 2005;99:871-6.
116. Chatterjee SS, Premachandran S, Bagewadikar RS, Bhattacharya S, Chattopadhyay S, Poduval TB. Arginine metabolic pathways determine its therapeutic benefit in experimental heatstroke: role of Th1/Th2 cytokine balance. *Nitric Oxide.* 2006;(15):408-16.
117. Chatzika K, Manika K, Kontou P, Pitsiou G, Zarogoulidis K, Papakosta D, et al. Moxifloxacin pharmacokinetics and pleural fluid penetration in patients with pleural effusion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(3):1315-19.
118. Chaves FJ, Mansego ML, Blesa S. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2007;20(1):62-9.
119. Chen T-C, Chang S-W. Moxifloxacin modulated TGF- β 1-related interleukin-12 secretion in corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.* 2017;58:5692-702.

120. Colleluori DM, Morris Jr SM, Ash DE. Expression, purification, and characterization of human type II arginase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001;389:135-43.
121. Combet S, Balligand JL, Lameire N, Goffin E, Devuyst O. A specific method for measurement of nitric oxide synthase enzymatic activity in peritoneal biopsies. *Kidney Int.* 2000;57(1):332-8.
122. Dalhoff A, Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infectious Disease.* 2003;3:359-71.
123. Demchuk HV. Estimation of safety of fluoroquinolones for therapy of community-acquired pneumonia of the patients with diabetes mellitus. *Visnyk Vinnytskoho Med. Univ.* 2014;18(2):525-8 (in Ukrainian).
124. Demir S, Ural D, Olgac M, Akdeniz N, Aktas-Cetin E, Gelincik A, et al. An unusual dual hypersensitivity reaction to moxifloxacin in a patients. *Asia Pac. Allergy.* 2018;8(3):26-31.
125. Derakhshan B, Hao G, Gross SS. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide /B. Derakhshan, *Cardiovasc. Res.* 2007;75:210-19.
126. Derkach NM, Shtrygol' SYu, Laryanovska YuB, Grashchenkova SA. The study of the acute and chronic toxicity of the drug «Decasan». *Вісник фармації.* 2016;3(87):70-5.
127. Dudikova ML, Vrynchanu NO, Dronova ML. New antibiotics of the quinolone series: prospects for use in medical practice. *Pharmacol. Med. Toxicol.* 2015;1(432):3-12 (in Ukrainian).
128. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.* 2002;53:503-14.
129. Fedorowich J, Saczewski J. Modification of quinolones and fluoroquinolones: hybrid compounds and dual action molecules. *Monatshefte fur Chemie – Chemical Monthly.* 2018;149:1199-245.
130. Ferrandiz MJ, Martín-Galiano AJ, Arnanz Z, Zimmerman T, de la Campa AG. Reactive Oxygen Species Contribute to the Bactericidal Effects of the

Fluoroquinolone Moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2016;60(1):409-17.

131. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003;15:247-54.

132. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Physiol. Rev.* 2010;459(6):923-39.

133. Forstermann U, Sessa W. Nitric oxide synthase: regulation and function. *Eur. Heart J.* 2012;33(7):829-37.

134. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain R. Role of nitric oxide in tumor progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2006;6(7):521-34.

135. Gavalas NG, Karadimou AP, Dimopoulos MA and Bamias AP. Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**; ID791603. 15p.

136. Gorodzanskaya EG, Larionova VB, Zubrikhina GN. Role of glutathione-dependent peroxidase in regulation of lipoperoxide utilization in malignant tumors. *Biochemistry.* 2001;66(2):221-4.

137. Holan V, Pindjakova J, Krulova M, Neuwirth A, Fric J, Zajícová A. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. *Transplantation.* 2006;81:1708-15.

138. Hrabarova E, Juranek I, Soltes L. Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. *Gen. Physiol. Biophys.* 2011;30(3):223-38.

139. Hsiao CJ, Younis H, Boelstli UA. Trovafloxacin, a fluoroquinolone antibiotic with hepatotoxic potential, causes mitochondrial peroxynitrite stress in a mouse model of underlying mitochondrial dysfunction. *Chem. Biol. Interact.* 2010;188:204-13.

140. Hu J, Mahmoud MI, el-Fakahany EE. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 2004;175(1-2):41-5.

141. Kanyuka O, Paul O. Future use of fluoroquinolone generation in treatment

- bacterial infections. *Nauk. Visnyk S. Gzhytskoho LNUVMBT*. 2011;2(48):107-11(in Ukrainian).
142. Kaynar H, Meral M, Turhan H. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2005;227(2):133-9.
143. Kolios G, Manousou P, Bourikas L, Notas G, Tsagarakis N, Mouzas I, et al. Ciprofloxacin inhibits cytokine-induced nitric oxide production in human colonic epithelium. *Eur. J. Clin. Invest*. 2006;36(10):720-9.
144. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy*. 2005;4(4):471-9.
145. Kovalenko IV, Onufrovykh OK, Fafula RV, Vorobets Z.D. Fluoroquinolones influence on the L-arginine/NO system activity in blood lymphocytes. *Slovak International Scientific Journal*. 2020;1(39):3-5.
146. Kovalenko IV, Onufrovykh OK, Fafula RV, Melnyk OV, Vorobets Z.D. Characteristics of antioxidant and NO-synthase systems of blood lymphocytes under the action of decamethoxine. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2020;1(88):15-22.
147. Kovalenko IV, Onufrovykh OK, Vorobets NM, Melnyk OV, Vorobets ZD. Arginase/NO-synthase system characteristics in blood lymphocytes under effect fluoroquinolones. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019;10(2):203-8.
148. Kovalenko IV, Onufrovykh OK, Melnyk OV, Korchynska OS, Vorobets NM, Vorobets ZD. Effect of fluoroquinolones on the activity of the glutathione system in the peripheral blood lymphocytes. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2019;3(87):23-9.
149. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenolreagent. *J. Biol. Chem*. 1951;193:265-75.
150. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2010;13(1):97-104.

151. Maarsingh H, Pera T, Meurs H. Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 2008;378:171-84.
152. Majhi A, Adhikary R, Bhattacharyya A, Mahanti S, Bishayi B. Levofloxacin-ceftriaxone combination attenuates lung inflammation in a mouse model of bacteremic pneumonia caused by multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* via inhibition of cytolytic activities of pneumolysin and autolysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(9):5164-80.
153. McGee EU, Samuel S, Boronea B, Dillard N, Milby MN, Lewis SJ. Quinolone allergy. *Pharmacy.* 2019;7:97-103.
154. Mannervik B. Glutathion peroxidase. *Meth. Enzym.* 1991;77:490-5.
155. Marushchak M, Markiv K, Krynytska I, Stechyshyn I. Glutathione antioxidant system of lymphocytes in the blood of patients in a setting of concomitant chronic obstructive pulmonare disease and arterial hypertension. *Pol. Merkur. Lekarski.* 2019;47(281):177-82.
156. Michalak K, Sobolewska-Wlodarczyk A, Wlodarczyk M Justyna Sobolewska, Woźniak P et al. Treatment of fluoroquinilone-associated disability: the pathobiochemical implications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017;2:1-15.
157. Michel T, Igarashi J, Greif D. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006;46:235-46.
158. Mielczarek M, Chrzanowska A, Ścibior D, A Skwarek, F Ashamiss, K Lewandowska, et al. Arginase as a useful factor for the diagnosis of colorectal cancer liver metastases. *Int. J. Biol. Markers.* 2006;21:404.
159. Mielczarek-Puta M, Chrzanowska A, Grabon W, Barańczyk-Kuźma A. Significance of arginase determination in body fluids of patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis before and after surgical treatment. *Clin. Biochem.* 2014;47(12):1056-9.
160. Mielczarek-Puta M, Chrzanowska A, E. Bara. New insights into arginase. Part I. Structure and characteristics. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008;62:206-13.
161. Mielczarek-Puta M, Chrzanowska A, Graboń W, Barańczyk-Kuźma A. New

insights into arginase. Part II. Role in physiology and pathology. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008;62:214-21.

162. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.* 2007;137(6):1616-20.

163. Mori M. Relationship between arginase activity and nitric oxide production. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric oxide: biology and pathology*. San Diego, CA: Academic Press; 2000. p. 199-208.

164. Morris CR, Poljakovic M. Arginine metabolism and pulmonary hypertension. *JAMA.* 2005;293:121-5.

165. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* 2005;294:81-90.

166. Morris CR, Vichinsky EP, Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhart D, Morris SM et al. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2003. 25:629-34.

167. Morris SM. Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.* 2004;134(10):43-7.

168. Morris SM Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 2007;137(6):1602.

169. Morris SM. Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;82(2):508-12.

170. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal. *Blood.* 2005. 105(6):2549-56.

171. Munder M, Rath M, Muller I, Rath M, Kropf P, Closs EI. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* 2014;5:532-5.

172. Mustaev K, Malik M, Zxao X, Kurepina N, Luan G, Oppegard LM et al. Fluoroquinolone-gyrase-DNA complex: two modes of drug binding. *J. Biol. Chem.* 2014;289:12300-12.

173. Nalla V, Veerareddy PR. Oxidative stress induced by fluoroquinolones on treatment for complicated urinary tract infections in Indian patients. *J. of Young*

Pharmacists. 2011;3(4):304-9.

174. Nazarchuk OA, Nahaichuk VI, SaldanYuJ, Kovalenko IV, Burkot VM. The research of the qualities in non-enzymatic bacteria, isolatet from patients with infectious complications. Abstract book of the II International scientific conference “Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century”; 2016 April, 14-15; Kyiv; 2016, p. 79-80.

175. Nazarchuk OA, Palii DV, Osadchuk NI. Research in sensitivity to antibiotics antiseptics in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Medicine and Medical Research. 2017;3(1):63-8.

176. Nazarchuk OA, Palii DV. Substantiation of overcoming of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical strains by usage of decamethoxinum. Annals of Mechnikov’s Institute. 2017;(2):28-33.

177. Nazarchuk O, Nahaichuk V, Kovalenko I, Paliy V. Microbiological aspects of the effectiveness of antimicrobial drugs. Journal of Education, Health and Sport, formerly Journal of Health Sciences. 2015;5(6):19-28.

178. Nomelini R, Ribeiro L, Tavares-Murta B, Jorge SA. Production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in ovarian cystic tumors. Mediators Inflamm. 2008;(10):1-7.

179. Obradovic M, Zafirovic S, Essack M, Dimitrov J, Zivkovic L, Spremo-Potparevic B, et al. Antioxidant enzymes expression in lymphocytes of paients undergoing carotid endarterectomy. Medical Hypotheses. 2 020;134:14-9.

180. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, Prostaglandins, and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma. Clinical Cancer Research January. 2007;(13):721-6.

181. Olayinka ET, Ore A, Ola OS. Influence of different doses levofloxacin on antioxidant defence systems and markers of renal and hepatic dysfunctions in rats. Advances in Toxicology. 2015;2015:23-9.

182. Ore A, Olayinka ET. Influence of moxifloxacin on hepatic redox status and plasma biomarkers of hepatotoxicity and nephrotoxicity sn rat. Biochemistry Reseach International. 2015;24:1-8.

183. Paliy D, Nazarchuk O, Gonchar O, Saldan Yu, Kovalenko I. Abstracts of the International conference for young scientists. Actual problem of microbiology and biotechnology. 2015 June 1-4; Odesa; 2015, p. 47.
184. Paliy GK, Nazarchuk OA, Nahajchuk VI, Osadchuk NI, Paliy DV, Kovalenko IV. Analytic prognostication of sensitivity of staphylococcus to fluoroquinolones. *Svit. Med. Biol.* 2015;3(51):103-6 (in Ukrainian).
185. Paliy G, Nazarchuk O, Osadchuk N, Kovalenko I, Paliy D. Prognostic criteria of sensitivity to antibiotics of staphylococcus clinical strains. *Journal of Education, Health and Sport* formerly *Journal of Health Sciences*. 2015;5 (7):26-33.
186. Pan H, Qin P, Liu R, Li J, Zhang F. Molecular mechanism on two fluoroquinolones inducing oxidative stress: evidences from copper/zinc superoxide dismutase. *RSC Advances*. 2016;94:1-5.
187. Payne JE, Bonnefous C, Symons KT, Nguyen PM, Sablad M, Rozenkrants N et al. Discovery of dual inducible/neuronal nitric oxide synthase (iNOS/nNOS) inhibitor development candidate 4-((2-cyclobutyl-1H-imidazo[4,5-b]pyrazin-1-yl)methyl)-7,8-difluoroquinolin-2(1H)-one (KD7332) part 2: identification of a novel, potent, and selective series of benzimidazole-quinolinone iNOS/nNOS dimerization inhibitors that are orally active in pain models. *J. Med. Chem.* 2010;53(21):7739-55.
188. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Sonda N, Taschin E, Ugel S, et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology*. 2007;212(9-10):795-812.
189. Pham DM, Ziora ZM, Blasovich AT. Quinolones antibiotics. *Med. Chem. Comm.* 2019;2:40-96.
190. Potjo M, Cockeran R, Theron AJ, Feldman C, Anderson R. Effect of moxifloxacin on human neutrophil and T-lymphocyte functions in vitro. *Pharmaceuticals*. 2010;3:3570-80.
191. Qin P, Lui R. Oxidative stress response of two fluoroquinilones with catalase and erythrocytes: a combined molecular and cellular study. *J. Hazard. Mater.* 2013;252:321-9.

192. Ridnour L, Thomas DD, Donzelli S, Espey MG, Roberts DD, Wink DA et al. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumorbiology. *Antioxid. Redox Signal.* 2006;8(7-8):1329-37.
193. Ridnour R, Thomas D, Donzelli S. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2008;45(1):18-31.
194. Riesbeck K. Immunomodulating activity of quinolones: review. *J. Chemother.* 2002;14(1):3-12.
195. Rubinstein E. History quinolones and their effects. *Chemotherapy.* 2012;47(3):44-8.
196. Saluja R, Jyoti A, Keshari R, Singh A, Kumar S, Dubey M, et al. Nitric-oxide synthase-nitric oxide involvement in the human neutrophil free radical generation: role of iNOS and Rac2 interaction. *J. Amer. Soc. Hematol.* 2012;120(21):1036-43.
197. Saluja R, Jyoti A, Chatterjee M. Molecular and biochemical characterization nitric oxide synthase isoforms and their intracellular distribution in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1813(10):1700-7.
198. Schmieder R, Edwards R. Insights into Antibiotic Resistance Through Metagenomic Approaches. *Future Microbiology.* 2012;7(1):73-89.
199. Shugaley VS, Kozina AS. Urea content and arginase activity in rat organs when acclimated to cold. *Physiol. J. USSR.* 1977;8:1199-1202 (in Russian).
200. Ścibior D, Czeczot H. Arginina – metabolizm i funkcje w organizmie człowieka. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2004;58:321-32.
201. Siddique YH, Ara G, Afzal M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response.* 2012;10(1):1-10.
202. Singh S, Kaur G, Mangla V, Gupta MK. Quinoline and quinolones: promising scaffolds for future antimycobacterial agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2015;30:3:492-504.
203. Shalit I, Horev L, Fabian I, Blau H, Kariv N, Shechtman I et al. Immunomodulatory and protective effects of moxifloxacin against *Candida albicans* - induced bronchopneumonia in cyclophosphamide in mice injected with

- cyclophosphamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46:2442-9.
204. Suer Gokmen S, Yoruk Y, Cakir E. [et al.] Arginase, Nitric Oxide Synthase, and Novel Inhibitors of L-arginine. *Trakua Univ. Tip. Fak. Derg.* 2005;22:76-81.
 205. Symons KT, Massari ME, Nguyen PM, Lee TT, Roppe J, Bonnefous C, et al. KLYP956 is a non-imidazole-based orally active inhibitor of nitric-oxide synthase dimerization. *Molecular Pharmacology*. 2009;76(1):153-62.
 206. Symons KT, Nguyen PM, Massari ME, Anzola JV, Staszewski LM, Wang L, et al. Pharmacological characterization of KLYP961, a dual inhibitor of inducible and neuronal nitric-oxide synthases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011;336(2):468-78.
 207. Talla V, Veerareddy PR. Oxidative stress induced by fluoroquinolones on treatment complicated urinary tract infections in indian patients. *J. Young Pharmacists*. 2011;3(4):304-9.
 208. Thannickal VJ. The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both? *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2003;284(1):24-25.
 209. Thomas SR, Chen K, Keaney JF. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2002;277:6017-24.
 210. Thomas S, Kotamraju S, Zielonka J, Harder DR, Kalyanaraman B. Hydrogenperoxide induced nitricoxide and proteasome activity in endothelial cell: a bell-shaped signaling response. *Free Radic. Biol. Med.* 2007;42(7):1049-61.
 211. Thomas DD, Ridnour LA, Espey MG, Donzelli S, Ambs S, Hussain SP, et al. Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling. *J Biol Chem.* 2006;281:25984-93.
 212. Thompson AM. Ocular toxicity of fluoroquinolones. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2007;35:566-77.
 213. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognosticsignificance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytesin ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2008. 108(2):415-20.
 214. Vorobets Z, Kimakovich O. Effect of proton pump blocker on enzyme activity

- of glutathione antioxidant system of the peripheral blood lymphocytes. *Annales Universitatis Mariae-Sklodowska*. 2006;19(1):131-4.
215. Wenter NK, Hecker NT, Sethi AK et al. Unnecessary use of fluoroquinolones antibiotics in hospitalized patients. *BMC Infections Diseases*. 2011;11:187-19
216. Werber S, Shalit I, Fabian I, Steuer G, Weiss T, Blau H. Moxifloxacin inhibits cytokine MAP kinase and NF-kB activation as well as nitric oxide synthesis in a human respiratory epithelial cell line. *J. Antimicrob. Chemother*. 2005;55:293-300.
217. Wu G, Bazer FW, Davis TA. Kim SW, Li P, Marc Rhoads J et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009;37(1):153-68.
218. Zhang H, Chen X, Noble SA, Bonnefous C, RixP, SmithN D, et al. Heteroaromatic-aminomethyl quinolones: potent and selective iNOS inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2012;22(2):1237-41.
219. Yadov V, Sultana S, Yadov J et al. Gatifloxacin induced S and G2-phase cell cycle arresting pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(10):275-82.
220. Yadov V, Talwar P. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotics to anti-cancer agents: an underestimated truth . *Biomedical and Pharmacotherapy*. 2019;111:934-46.
221. Yu M, Zhang J. Repositioning of antibiotic levofloxacin as a mitochondrial biogenesis inhibitor to target breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2016;471(4):639-45.