

Рецензія

офіційного рецензента кандидата біологічних наук Стефанишин Ольги Михайлівни, старшого наукового співробітника Інституту біології тварин НААН, на дисертаційну роботу ЛЮБАС НАТАЛІЇ МИРОНІВНИ на тему «Антимікробна та біохімічна дія сульфуровмісних синтетичних сполук на окремі ланки метаболізму в організмі щурів» на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія», що подана в разову спеціалізовану вчену раду ДФ 35.368.005 Інституту біології тварин НААН

1. Актуальність теми дисертаційного дослідження.

Прогрес у дослідженні сірковмісних сполук відіграє важливу роль у розвитку різних галузей біології, тваринництва та медицини. Практичне використання знаходять як природні, так і синтетичні похідні сульфуровмісних сполук, зокрема, тіосульфоестери, що відомі як цінні сульфенілюючі реагенти та сполуки з широким спектром та високим індексом біологічної активності. Адже здатність сульфуру перебувати в різних ступенях окиснення дає можливість утворення низки моно- та дисульфуровмісних речовин. Синтез і дослідження цих сполук сприяють створенню нових лікарських засобів.

Висока реакційна здатність S-естерів тіосульфокислот є результатом особливостей будови тіосульфогрупи ($-SO_2-S-$), передусім унаслідок високої полярності зв'язку $-S-S-$, який суттєво залежить від природи кислотного і тіольного складників, що у свою чергу впливає на їхню біологічну активність і реакційну здатність та визначає сферу можливого практичного застосування. Перерозподіл електронної густини та зміна реакційної здатності в біохімічних реакціях надає сполукам цього класу можливість використання їх як високоефективних біологічно активних субстанцій.

Природні тіосульфінати і тіосульфонати здавна використовувалися для лікування бактеріальних інфекцій, вони проявляють широкий спектр антибіотичної дії проти грампозитивних і грамнегативних бактерій

Проведення ґрунтовного дослідження антимікробних властивостей синтетичних сірковмісних сполук як перспективних речовини для захисту кормів від контамінації їх грибами, а також їх впливу на організм тварин є необхідним для визначення їхнього використання у тваринництві. Головним критерієм оцінки можливого використання нових препаратів є з'ясування їх дії на метаболічні процеси в організмі тварин. Тому дослідження впливу новосинтезованих S-естерів тіосульфокислот на систему антиоксидантного захисту та окремі ланки білкового і ліпідного обміну в організмі тварин є вкрай важливими з метою застосування їх в лікувальних та профілактичних цілях.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дослідження, що увійшли до дисертаційної роботи, виконувались упродовж 2019-2023 рр. та є частиною науково-дослідної роботи лабораторії біохімії адаптації та онтогенезу тварин Інститут біології тварин НААН згідно із завданнями «Вивчити фізіолого-біохімічні механізми дії біологічно активних речовин на метаболічні процеси в організмі тварин», ДР 0116U001413 (2019-2020 рр.) та 43.00.02.03.Ф. ДР 01214109057 «Дослідити адаптивні та метаболічні процеси в організмі тварин за дії біологічно активних речовин різного походження», у яких дисертантка була співвиконавцем і досліджувала процеси пероксидного окиснення ліпідів, активність антиоксидантної системи, окремі показники білкового та ліпідного обміну за впливу різних естерів тіосульфокислот.

3. Ступінь обґрунтування основних положень і висновків сформульованих у дисертації, їх достовірність.

Наукові положення, висновки та практичні рекомендації обґрунтовані належним чином. Для виконання поставлених завдань було проведено дослідження в декілька етапів. Згідно поставлених завдань дисертаційної роботи було проведено дослідження антимікробних та радикал-поглинальних властивостей естерів тіосульфокислот, а також їх впливу на окремі ланки білкового та ліпідного обміну, інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність системи антиоксидантної системи у крові та тканинах щурів.

У результаті дослідження *in vitro* фунгібактерицидної активності синтетичних тіосульфоестерів S-метил-4-амінобензентіосульфонату (МТС), S-етил-4-амінобензентіосульфонату (ЕТС), S-аліл-4-амінобензентіосульфонату (АТС), S-пропіл-4-амінобензентіосульфонату (ПТС) і S-аліл-4-ацетиламінобензентіосульфонату (ААТС) щодо 5 референтних штамів тест-мікроорганізмів *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium luteum*, *Candida tenuis*, *Aspergillus niger*, встановлено, що найвищу активність по відношенню до усіх штамів ілюстрували ЕТС, АТС та ААТС. Для тіосульфоестерів визначено мінімальні значення інгібувальних і бактерицидних концентрацій щодо тестованих штамів мікроорганізмів, що дозволяє характеризувати їх як перспективні антимікробні речовини. У дослідях *in vitro* з'ясовано, що найвищі показники радикал-поглинальної та антиоксидантної активності характерні для АТС, ААТС, ЕТС.

Результати, одержані в дослідях *in vitro*, враховані при подальших дослідженнях тіосульфонатів, які представляють інтерес як потенційні сполуки для захисту кормів від патогенів при їх виробництві та зберіганні. Тому в наступних дослідях *in vivo* були використані сполуки – ЕТС, АТС, ААТС, які проявили найбільшу антимікробну та антиоксидантну активності.

Дослідження *in vivo* проведені у віварії Інституту біології тварин НААН на білих лабораторних щурах лінії Вістар масою тіла від 180 до 220 г. Експерименти проводили згідно із законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 26.02.2006р. та «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що погоджені з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1985). Під час експерименту тварини утримувались у стандартних умовах за постійного температурного режиму, вологості та освітлення, з підтриманням годівельного та питного режиму на рівні, рекомендованому нормами утримання лабораторних тварин.

Дослідження проводили у два етапи, відповідно до досліджуваних доз естерів тіосульфонатів – 100 і 50 мг/кг маси тіла. Лабораторні щури були поділені на чотири групи по 5 тварин у кожній: I — контрольна, II, III, IV — дослідні. Тваринам контрольної групи одноразово щодоби до корму додавали 0,5 см³ олії. Тваринам дослідних груп до корму додавали по 0,5 см³ олійних розчинів естерів тіосульфонатів у дозах 100 і 50 мг/кг маси тіла, зокрема II групі — ЕТС; III — АТС; IV — ААТС. Для приготування олійних розчинів синтезованих сполук, використовували олію марки «Олейна» (традиційна рафінована, дезодорована, виморожена; виробник ПрАТ з П «ДООЗ»; сертифіковано згідно зі стандартом ДСТУ 4492:2017 та відповідно до вимог ISO 14024). У крові і тканинах щурів досліджували вплив ЕТС, АТС, ААТС на систему антиоксидантного захисту та окремі ланки білкового та ліпідного обміну.

В дисертації наведена достатня кількість таблиць, рисунків, що покращує сприйняття роботи, узагальнює фактичний матеріал і підтверджує, що отримані результати наукового дослідження вірогідні та обґрунтовані.

4. Наукова новизна досліджень та отриманих результатів.

Вперше встановлено високі фунгібактерицидні властивості S-етил-4-амінобензентіосульфонату (ЕТС), S-аліл-4-амінобензентіосульфонату (АТС), S-аліл-4-ацетиламінобензен-тіосульфонату (ААТС) по відношенню до штамів мікроорганізмів *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium luteum*, *Candida tenuis*, *Aspergillus niger*, що дозволяє характеризувати досліджувані тіосульфоестери як перспективні антимікробні речовини. Виявлено, що найвищу радикалпоглинальну активність проявляв АТС. Ацилювання аміногрупи в ААТС приводить до зниження радикалпоглинальної активності тіосульфонату. ЕТС проявляв нижчу радикалпоглинальну активність, ніж АТС та ААТС, але все ж достатню, щоб проявляти антиоксидантні властивості.

З'ясовано, що вплив ЕТС, АТС та ААТС на метаболічні процеси в організмі щурів залежить від їх дози та реалізується внаслідок їх безпосередньої дії на

конкретні мішені, якими є окремі ланки білкового та ліпідного обміну, а також про/антиоксидантна система в крові й тканинах щурів. Отримані результати досліджень поглиблюють уявлення про новосинтезовані сполуки S-естерів тіосульфокислоти, які завдяки високій реакційній здатності та широкому спектру дії у визначених дозах можуть бути запропоновані як нові терапевтичні засоби. Вперше встановлено, що найвищу радикалпоглинальну активність проявляв АТС, дещо уступав по активності ААТС, який відрізнявся будовою радикалу в п-положенні бензенового кільця, а ЕТС проявляв дещо нижчу радикалпоглинальну активність ніж АТС та ААТС.

Вперше виявлено, що S-естери тіосульфокислот у дозах 100 і 50 мг/кг є ефективним у регуляції стану про/антиоксидантної системи та окремих ланок білкового і ліпідного обмінів в організмі тварин. За регуляції про/антиоксидантної системи кращий позитивний ефект виявляла сполука АТС, далі – ЕТС і ААТС у дозі 50 мг/кг, ніж у дозі 100 мг/кг. За регуляції ліпідного обміну було виявлено, що гіполіпідемічні ефекти проявляли ААТС у дозі 100 мг/кг, а ЕТС і АТС у дозі 50 мг/кг. За регуляції білкового обміну встановлено, що більш сприятливий вплив на білоксинтезувальну функцію проявляли ЕТС і АТС у дозі 100 мг/кг, однак і в дозі 50 мг/кг усі S-естери тіосульфокислот позитивно впливали на показники білкового обміну в крові.

5. Теоретичне та практичне значення роботи й впровадження отриманих результатів.

У дисертації експериментально обґрунтовано можливість застосування S-естерів тіосульфокислот як антимікробних речовин для захисту кормів від контамінації їх грибами, а також з метою регуляції метаболічних процесів в організмі тварин. Результати досліджень дозволяють припустити, що застосування у відповідних кількостях S-естерів тіосульфокислот можуть бути привабливим терапевтичним підходом для регуляції метаболічних процесів в організмі тварин. У дослідженнях встановлено, що застосування S-естерів тіосульфокислот в дозах 100 і 50 мг/кг маси тіла дозволяє регулювати окремі ланки білкового і ліпідного обмінів та стан про/антиоксидантної системи в організмі. Різна дія досліджуваних естерів сульфокислот на різні ланки обмінних процесів у крові та тканинах тварин може бути зумовлена як специфікою та фізіологічними особливостями цих тканин, так і біохімічними особливостями досліджуваних сполук в різних дозах. Ці сполуки представляють безперечний практичний інтерес як моделі для вивчення взаємозв'язку між структурою і біологічною активністю. Завдяки високій реакційній здатності тіосульфонати можуть бути запропоновані як нові лікарські засоби. Вони проявляють надзвичайно широкий спектр біологічної дії поруч з низькою токсичністю,

мають сильніші лікувальні властивості і є стабільнішими, ніж їх близькі природні аналоги.

Результати досліджень впроваджені в навчальний процес та науково-дослідну роботу кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

6. Повнота викладу матеріалу дисертації в опублікованих працях.

За результатами дисертації опубліковано 21 наукова праця: 5 статей (3 з яких опубліковані у виданнях, що належать до наукометричної бази Scopus та Web of Science), 16 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій, конгресів, форуму, симпозіуму та інших наукових заходах.

7. Обсяг та структура роботи, оцінка змісту дисертації та її завершеність.

Рукопис роботи Любас наталії Миронівни складено за загальноприйнятою схемою і вимогами до дисертацій. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел і додатків.

Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, власних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота викладена на 188 сторінках рукопису, обсяг основного тексту складає 128 сторінок. Дисертація містить 19 таблиць, 24 рисунки, 242 джерела цитованої літератури (40 кирилицею і 202 латиницею).

У вступі здобувач розкриває актуальність обраної теми дослідження, чітко сформульована мета і завдання дослідження, показані наукова новизна, теоретична і практична значимість отриманих результатів, особистий внесок здобувача.

В огляді літератури проаналізовані дані з наукових джерел, які висвітлюють взаємозв'язок будови та біологічної дії тіосульфоестерів для цілеспрямованого синтезу нових біологічно активних субстанцій з комплексом заданих властивостей.

У розділі 2 «Матеріал і методи» автор подає об'єкти і передумови досліджень, схему досліджень та опис комплексу застосованих сучасних методик – у роботі використано мікробіологічні, біохімічні (визначення концентрації продуктів пероксидного окиснення ліпідів, активність ензимів антиоксидантного захисту, активність ензимів білкового обміну, концентрацію загальних ліпідів, триацилгліцеролів і холестеролу), хроматографічні

(визначення класів ліпідів, фракції білків) та статистичні. Планування дослідів здійснювали згідно з принципом 3R щодо зменшення використання лабораторних тварин та принципів гуманного поводження з ними.

Розділ 3 дисертантка присвятила дослідженню антимікробних та радикал-поглинальних властивостей естерів тіосульфокислот, а також їх впливу на окремі ланки білкового та ліпідного обміну, інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність системи антиоксидантної системи у крові та тканинах щурів. Результати досліджень дозволяють припустити, що застосування у відповідних кількостях S-естерів тіосульфокислот, як потенційних сполук для захисту кормів від патогенів при їх виробництві та зберіганні, можуть сприятливо впливати і на метаболічні процеси в організмі тварин, що споживають дані корми. Ці сполуки, що володіють антиоксидантними, білоксинтезувальними та атерогенними властивостями, можуть бути основою для розробки нових засобів для регуляції метаболічних процесів в організмі тварин.

В розділі 4 обговорення результатів дослідження наведено аналіз проведених результатів досліджень та співставлення їх з даними літератури,

За результатами роботи зроблено 8 висновків, які відповідають отриманим результатам.

Список використаних джерел складено згідно з існуючими вимогами із чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань.

8. Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності.

При рецензуванні дисертаційної роботи не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації, текстових запозичень чи інших порушень. Усі ідеї та положення, викладені у дисертаційній роботі, належить автору.

9. Зауваження і побажання щодо змісту та оформлення дисертації.

Не зважаючи на усі позитивні моменти дисертаційної роботи Любас Н.М проте є деякі зауваження і побажання і після аналізу роботи виникли деякі дискусійні питання, на які варто почути відповідь дисертантки:

1. Перелік умовних позначень слід було подавати українською аббревіатурою усі скорочення і після першого використання повної назви давати у тексті уже скорочення.
2. Скорочення тіосульфонатів є у розділі 2 «Матеріал і методи», а слід їх перенести у перелік умовних позначень.
3. У дисертаційній роботі є ряд запозичених схем із літературних джерел, але не вказані посилання на них.

4. Чому саме ці види бактерій і грибів були вибрані для дослідження *in vitro* фунгібактерицидної активності синтетичних тіосульфоестерів?
5. У дослідженнях *in vivo* на білих лабораторних щурах було б позитивним моментом вивчення стану мікробоценозу тварин, оскільки було доведено у дослідах *in vitro*, що досліджувані тіосульфоестери є перспективними антимікробними речовинами.
6. Чому у дослідженнях зупинилися на дозах сульфоестерів у кількості 50 мг і 100 мг? Чи зустрічали ви у літературних даних використання таких доз у дослідженнях на тваринах?
7. Висновки потрібно скоротити і константувати у них лише вірогідні значення.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Любас Наталії Миронівни на тему «Антимікробна та біохімічна дія сульфуровмісних синтетичних сполук на окремі ланки метаболізму в організмі щурів» на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія», за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, практичним значенням одержаних досліджень та висновків відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44, а її автор, Любас Наталія Миронівна заслуговує на присудження ступення доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія».

Рецензент:

провідний науковий співробітник
лабораторії фізіології, біохімії та
живлення птиці Інституту біології
тварин НААН, кандидат біологічних
наук, ст. н. с.



Ольга СТЕФАНІШИН

Підпис к.б.н., с.н.с. Стефанишин О.М.

завіряє вчений секретар Інституту біології
тварин НААН

Оксана СМОЛЯНІНОВА