

ВІДГУК

офіційного опонента про результати дисертаційної роботи
**КОВАЛЕНКО Ірини Володимирівни «Антимікробна дія декаметоксину та
фторхінолонів і їх вплив на аргіназа/NO-синтазну та антиоксидантну
системи лімфоцитів крові» представлену в Спеціалізовану вчену раду
ДФ 35.368.001 в Інституті біології тварин НААН на здобуття наукового
ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія**

Актуальність теми дисертаційної роботи. Триваюче зростання кількості резистентних до дії антибактеріальних засобів штамів мікроорганізмів потребує впровадження в клінічну практику нових безпечних і ефективних препаратів. Лікарські засоби відрізняються, як за своїм спектром дії, так і за фармакокінетичними показниками та за механізмом інгібуючого ефекту, який забезпечує бактерицидну або бактеріостатичну активність. Перспективним класом для пошуку нових сполук є фторхінолони – препарати, які проявляють активність, як відносно грамнегативної мікрофлори, так і відносно стафілококів. Спектр активності фторхінолонів включає грампозитивні аеробні бактерії (*Staphylococcus* spp.) та більшість штамів грамнегативних мікроорганізмів. Хінолони/фторхінолони проявляють бактерицидний ефект, інгібують ДНК-гіразу та топоізомеразу IV, порушуючи синтез ДНК. Виникнення та поширення резистентних штамів мікроорганізмів потребує пошуку сполук з виразною антибактеріальною дією з метою розробки на їхній основі нових безпечних та ефективних лікарських препаратів.

Важливе місце в етіотропній терапії гнійно-запальних ускладнень займають антисептики та антибіотики, що активні стосовно патогенної мікрофлори. 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. Актуальним є прогнозування рівня ефективності фторхінолонів шляхом використання комплексного математичного аналізу даних про чутливість клінічних штамів стафілококу. Завдяки широкому спектру антимікробної дії, низькій токсичності, позитивними фармакокінетичними властивостями такий антисептик як декаметоксин та антибіотики – фторхінолони широко використовуються при лікуванні бактеріальних інфекцій різної локалізації.

Оскільки, декаметоксин і фторхінолони володіють, як гідрофільними, так і ліпофільними властивостями, то вони прямо через кров, слизові оболонки, шкіру тощо можуть проникати в клітини, кров'яне русло та потрапляти до різних органів та тканин і, таким чином, проявляти різноманітні біохімічні зміни у показниках та фармакологічні ефекти. Встановлено, що фторхінолони можуть індукувати оксидативний стрес і впливати на активність ензимів антиоксидантного захисту.

Для виявлення патологічних процесів, фізіологічних і біохімічних змін макроорганізму, зокрема, спричинених дією фармпрепаратів, відбувається пошук нових біохімічних маркерів, які б усували побічну дію лікарських засобів. У цьому аспекті, роль Нітроген (II) оксиду, як універсального клітинного та тканинного метаболіту в регуляції клітинних функцій і паракринного регулятора міжклітинних і міжсистемних взаємодій, не викликає сумніву. Оскільки, синтез NO здійснюється за участю NO-синтази з *L*-аргініну шляхом окисного метаболізму. Нітроген (II) оксид бере участь у модифікації метаболізму ксенобіотиків, порушує вільнорадикальний гомеостаз клітин і, таким чином, доведено тісний взаємозв'язок між NO-синтазою та про/антиоксидантними системами.

Виходячи з вищенаведеного, дисертаційна робота Коваленко Ірини Володимирівни на тему «Антимікробна дія декаметоксину та фторхінолонів і їх вплив на аргіназа/NO-синтазну та антиоксидантну системи лімфоцитів крові» є актуальною та відповідає сучасним потребам медичної науки та практики.

Зв'язок теми дисертації з плановими науковими дослідженнями та науковими програмами. Дисертаційна робота є фрагментом планової наукової теми 35.00.02 лабораторії обміну речовин ім. С.З. Гжицького 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).

Наукова новизна дослідження та одержаних 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 дека сан 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 клітини стафілококів та ешеріхій зменшився. У стафілококів і *C. Albicans* повільно формується стійкість *in vitro* до декаметоксину та декасану. У клінічних штамів золотистого стафілококу 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 у порівнянні з іншими фторхінолонами. Фторхінолони не впливали на активність iNOS лімфоцитів, виділених із крові практично здорових жінок. Після індукування активності iNOS гідроген пероксидом всі фторхінолони призводили до інгібування активності ензиму. Декаметоксин практично не впливав на пер оксидацію 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, грибів і впливу на регуляторні системи лімфоцитів крові – аргіназа/NO-синтазну, глутатіонову та антиоксидантну.

Теоретичне та практичне значення роботи. 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 глутатіонової 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 наукову роботу ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України».

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Завдання дослідження цілком відповідають поставленій меті. Побудова та організація роботи логічні та послідовні. 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. У дослідженнях застосовані сучасні об'єктивні методики, які адекватні поставленим завданням. Їх вибір є достатнім та інформативним для вирішення поставлених завдань. В розділі роботи чітко та структуровано описано усі методи дослідження (антимікробних властивостей декаметоксину, адгезивних властивостей бактерій за дії декаметоксину, резистентності бактерій до декаметоксину, аналітичне прогнозування чутливості бактерій до фторхінолонів, виділення лімфоцитів периферичної крові, визначення біохімічних маркерів). Об'єм проведених досліджень дозволив автору різносторонньо та достовірно дослідити проблему та в повній мірі обґрунтувати запропонований шлях її вирішення.

Структура проведеної роботи є адекватною вирішенню завдань дослідження. Статистичну обробку результатів проведено в повному обсязі, з урахуванням усіх особливостей даних, їх вірогідність не викликає сумнівів.

Висновки сформульовані в повній мірі, вони є лаконічними та обґрунтованими.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація Коваленко І. В. побудована традиційно, згідно вимог до дисертацій на отримання ступеня доктора філософії і містить 162 сторінки друкованого тексту, проілюстрована 12 таблицями та 29 рисунками, які є інформативними та наочними, містить анотацію, список публікацій здобувача, вступ, огляд літератури, розділ матеріалів і методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел складається із 221 бібліографічних описів (92 кирилицею, 129 іноземними мовами), додатки. Список використаних джерел викладено на 23 сторінках.

Текст дисертації, як за змістом, так і редакційно, викладено та оформлено дисертантом якісно. Викладення основних положень за стилем та термінологією заслуговує позитивної оцінки.

Характеристика розділів роботи. У вступі автор обґрунтовує актуальність обраної теми, розкриває зв'язок з науковою програмою, формулює

мету та задачі дослідження, наукову новизну та практичне значення роботи, особистий внесок здобувача, апробацію дисертації, наводить кількість публікацій за темою дисертаційної роботи. Дисертант досить повно відобразив сутність і стан наукової проблеми та її значущість, підстави та вихідні дані для розроблення теми, обґрунтував необхідність проведення дослідження за темою дисертаційної роботи.

У 1-му розділі автор інформативно розкриває тему особливості антимікробної дії декаметоксину та його вплив на регуляторні системи клітини, а також, антимікробної дії фторхінолонів та їх вплив на регуляторні системи клітини, мофо-функціональній характеристика лімфоцитів крові, функціональній характеристиці та ролі аргінази лімфоцитів крові, пероксидації ліпідів і системі антиоксидантного захисту. Значна увага приділяється функціональній характеристиці та ролі Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові.

У 2-му розділі автор структурує та детально описує усі матеріали та методи, використані в даному дослідженні. Детально та інформативно описано усі етапи дослідження, їх дизайн та методи. Методики проведених досліджень є сучасними та повністю відповідають реалізації поставлених завдань, вони покроково описані в повному обсязі. Статистична обробка проведена з урахуванням особливостей отриманих результатів.

У розділі 3 опубліковано дані, що стосуються антимікробної дії декаметоксину та фторхінолонів. Детально проаналізовано вплив декаметоксину на адгезію бактерій, характеристика резистентності мікроорганізмів до декаметоксину та антимікробна властивість фторхінолонів та декаметоксину. Розділ інформативно ілюстрований значною кількістю таблиць та графіків.

Розділ 4 присвячено дослідженню впливу декаметоксину та фторхінолонів на аргіназа/NO-синтазну систему лімфоцитів крові. Автором проведено дослідження аргіназної активності лімфоцитів крові за дії декаметоксину та фторхінолонів та активності конститутивної та індукційної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові за дії декаметоксину та фторхінолонів.

У розділі 5 представлені результати експериментального етапу дисертаційної роботи з дослідження впливу декаметоксину та фторхінолонів на про- та антиоксидантну системи лімфоцитів крові. Автором показано, що антисептик декаметоксин суттєво впливає на регуляторні механізми клітини, зокрема лімфоцити крові. Активує ензими глутатіонової антиоксидантної системи.

Дисертантом проведено порівняльне дослідження процесів перекисного окиснення ліпідів і системи глутатіону в лімфоцитах периферичної крові при дії фторхінолонів II – IV поколінь, а саме, ципрофлоксацину, левофлоксацину, моксифлацину та було встановлено, що дані антибіотики суттєво активують процеси перекисного окиснення ліпідів у лімфоцитах та одночасно активують основні ензими антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидазу та глутатіонтрансферазу.

У розділі 6 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» автор чітко узагальнює усі отримані результати, порівнюючи свої дані з літературними, що свідчить про його вміння фахово аналізувати та обґрунтовувати результати наукових досліджень.

Висновки логічні та відображають отримані результати, відповідають меті та завданням дослідження та свідчать про завершеність роботи.

Список літератури складений грамотно, згідно вимогам бібліографічного опису.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. 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. Сукупність усіх публікацій у повній мірі відображає викладені в дисертації результати дослідження. Зміст анотації є ідентичним до основних положень дисертації.

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-й 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 Міжнародній 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).

Матеріали для наукової дискусії. Питання, пропозиції та зауваження.

Позитивно оцінюючи роботу в цілому, слід відзначити деякі побажання:

1. Рекомендовано у розділі 2 можна було б не наводити детальний опис кожного методу дослідження, а лишень принцип методу та писання на бібліографічне джерело.
2. Доцільно було б у розділах 3, 4 та 5 по тексту дисертаційної роботи не дублювати цифрові табличні дані, а використати відсоткове співвідношення або навести зміну активності того чи іншого показника у разях.
3. При дослідженні впливу декаметоксину та фторхінолонів на про- та антиоксидантну системи лімфоцитів крові (розділ 5) рекомендовано було б навести табличний цифровий матеріал для кращого сприйняття, щоб можливо було проаналізувати вірогідність отриманих результатів автором, а не лишень рисунки.
4. Також трапляються незначні стилістичні та граматичні недоліки.

Однак вказані критичні міркування не зменшують науково-теоретичного і практичного значення дисертації Коваленко І. В. та цінність отриманих результатів.

Варто відзначити, як вагомий позитивний момент, значну кількість та інформативність досліджуваних показників та визначення кінетичних параметрів NO-синтазної активності лімфоцитів крові при дії фторхінолонів, а також їх різнонаправленість.

Також важливим позитивним фактором є те, що автором, як підсумок запропоновано узагальнюючу схему мікробіцидних і біохімічних ефектів декаметоксину та антибіотиків фторхінолонового ряду.

При рецензуванні дисертації виникли наступні запитання дискусійного характеру:

1. За рахунок якого механізму дії, антибіотики ряду фторхінолонів, які Вами було використано для дослідження призводили до підвищення активності глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази в лімфоцитах крові. Як на Вашу думку, що є пусковим механізмом у цьому процесі?

2. В якій дозі Вами було обрано для дослідження декаметоксин? Адже декаметоксин належить до групи бісчетвертичних амонієвих сполук, виявляє

антисептичну дію, у концентрації 0.01-8.0 мкг/мл діє бактерицидно на коринебактерії дифтерії, а у концентрації 0.03-0.1 мкг/мл пригнічує утворення екзотоксину.

3. Обраний Вами для дослідження препарат декаметоксин призводив до інгібування активності конститутивної ізоформи NO-синтази із одночасною активацією індукцибельної ізоформи NO-синтази у лімфоцитах крові. Як Ви це можете пояснити?

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам. На підставі вищенаведеного можна дійти висновку, що дисертаційна робота **КОВАЛЕНКО Ірини Володимирівни «Антимікробна дія декаметоксину та фторхінолонів і їх вплив на аргіназа/NO-синтазну та антиоксидантну системи лімфоцитів крові»** є самостійним, закінченим науковим дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове вирішення актуального наукового напрямку мікробіології та біохімії. За актуальністю, об'ємом, використанням методів досліджень, новизною отриманих даних і їх практичним значенням подана дисертація відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року та Постанови Кабінету Міністрів України № 167 від 6 березня 2019 року «Про проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», а її автор Ірина Володимирівна КОВАЛЕНКО заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (03.00.04 – біохімія).

Офіційний опонент:
Декан медичного факультету
Тернопільського національного
медичного університету
ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України,
доктор біологічних наук,
професор кафедри медичної біохімії



завіряю

заступник ректора з кадрових питань
Тернопільського національного
медичного університету

П. ЛИХАЦЬКИЙ

