

Рецензія

офіційного рецензента кандидата біологічних наук Стефанишин Ольги Михайлівни, старшого наукового співробітника Інституту біології тварин НААН, на дисертаційну роботу **Зеленіної Оксани Михайлівни на тему «Метаболічні процеси в організмі щурів за дії енрофлорсацину, пегельованого ПЕГ-400»** на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія», що подана в разову спеціалізовану вчену раду ДФ 35:368.003 Інституту біології тварин НААН

1. Актуальність теми дисертаційного дослідження.

На сучасному етапі розвитку гуманної та ветеринарної медицини антибактеріальні засоби (антибіотики) є найбільш ефективними препаратами для лікування захворювань, що викликаються мікроорганізмами. Пошук нових антибіотиків має бути спрямовано на розроблення препаратів, що мають змінену молекулярну структуру та цілеспрямовано діють на відповідні бактеріальні клітини, з'єднані з новою речовиною для транспортування в уражені ділянки, нечутливі до дії захисних ензимів клітин мікроорганізмів. Антибіотик енрофлорсацин відноситься до класу найуспішнішої групи синтетичних антибіотиків – фторхінолонів. Він характеризується широким спектром активності проти цілого ряду грамнегативних і грампозитивних бактерій. Енрофлорсацин сьогодні успішно використовується у ветеринарній медицині для лікування багатьох бактеріальних захворювань. Тому дисертаційна робота Зеленої О. М. є актуальною оскільки проведені нею дослідження були спрямовані на вивчення *in vitro* антимікробної дії традиційного та новоствореного пегельованого антибіотику енрофлорсацину, а також вплив внутрішньом'язового введення лабораторним тваринам на стан гемопоезу, гемостазу, резистентність, антиоксидантну систему, рівень гепатотоксичності та нефротоксичності, а також порівняла з нанополімером ПЕГ-400, який використовували для його створення.

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

Дисертаційна робота виконана впродовж 2018–2022 років у лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН та Багатопрофільній лабораторії ветеринарної медицини Одеського державного аграрного університету (ОДАУ). Мікробіологічні дослідження було проведено у Державному науково-дослідному контрольному інституті ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів, а гістологічні дослідження тканин – на кафедрі нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії ОДАУ. Створення та синтез нанополімеру ПЕГ-400 та пегелювання антибіотика

енрофлорсацину проведено в лабораторії кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка».

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. На початку експерименту, спільно з вченими НУ «Львівська політехніка» провели пегелювання антибіотика енрофлорсацину шляхом приєднання до кінців поліоксиетиленових гідрофільних закінчень нанополімеру ПЕГ-400 карбоксильних закінчень антибіотика енрофлорсацину. На другому етапі досліджено *invitro* антимікробну дію пегельованого антибіотика енрофлорсацину та традиційного антибіотика енрофлорсацину. Для вивчення антимікробної дії досліджуваних препаратів визначали мінімальну інгібуючу концентрацію до еталонних музейних штамів (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 11105) та польових (*Streptococcus epidermidis*, *Enterobacter*) мікроорганізмів

На третьому етапі було досліджено вплив пегельованого антибіотика енрофлорсацину, традиційного антибіотика енрофлорсацину та нанополімеру ПЕГ-400 на функціональний стан і структуру органів та систем організму тварин. Для цього було створено 4 групи щурів: контрольну і три дослідні. Всім щурам, які були в експерименті, протягом чотирьох діб, щоденно внутрішньом'язово вводили 0,03 мл досліджуваних препаратів. Вміст антибіотика енрофлорсацину у пегельованій і традиційній формі у розчині складав 1,8 %. Контрольній групі тварин проводили ін'єкцію 0,03 мл фізіологічного розчину.

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.

Уперше дисертанткою проведено пегелювання антибіотика енрофлорсацину, комплексно досліджено його вплив на мікроорганізми та організм лабораторних тварин. Отримано нові дані дії пегельованого антибіотика енрофлорсацину на метаболічні процеси в організмі лабораторних тварин і досліджено антибактеріальні властивості, проведено порівняння з традиційним антибіотиком енрофлорсацином і нанополімером ПЕГ-400, які використовувалися для його створення. Встановлено, що пегелювання антибіотика енрофлорсацину веде до покращення його антимікробних властивостей щодо музейні штамів мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105. Водночас, мінімальна інгібуюча концентрація на музейні штамів

мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P і польові штами грампозитивних (*Streptococcus epidermidis*) та грамнегативних (*Enterobacter*) мікроорганізмів була однаковою для антибіотика енрофлорсацину як у традиційній субстанції, так і у пегельованій формах. Дослідження пегельованого антибіотика енрофлорсацину *in vivo* на лабораторних щурах після чотириразової внутрішньом'язової ін'єкції показало кращу біосумісність для організму, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлорсацину. Вперше з'ясовано, що введення в організм щурів пегельованого антибіотика енрофлорсацину не спричиняє патологічних змін гемопоезу, не має негативного впливу на фактори згортання крові, не спричиняє запальної реакції, має незначну та короткотривалу дію на стан антиоксидантної системи організму, низьку гепатотоксичність та нефротоксичність, порівняно з антибіотиком енрофлорсацином у традиційній формі. Незначні зміни метаболічних процесів в організмі щурів після внутрішньом'язових ін'єкцій пегельованого антибіотика енрофлорсацина можуть спостерігатися лише у перші дні, а за введення традиційної субстанції антибіотика енрофлорсацина до 21-ої доби.

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

Проведені дослідження показали, що пегелювання антибіотика енрофлорсацину покращує його антимікробну дію. Чотириразові внутрішньом'язові ін'єкції тваринам пегельованого антибіотика енрофлорсацину можуть мати короткотривалий та незначний негативний вплив на організм, порівняно з введенням традиційної форми антибіотика енрофлорсацину, за якого встановлено гепатотоксичність, нефротоксичність та негативну дію на антиоксидантну систему. Проведене спільно з вченими НУ «Львівська політехніка» пегелювання антибіотика енрофлорсацину, а також вивчені нами антимікробної дії та дослідження біосумісності й токсичності його на організм тварин показало перспективність впровадження розробки у фармацевтичну промисловість України.

Результати впроваджено в навчально-педагогічний процес кафедри фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету, кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка», кафедри фізіології Одеського державного медичного університету, кафедри фармакології та токсикології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, кафедри клініко-лабораторної діагностики та фармакології і кафедри генетики, фізіології рослин та мікробіології ДВНЗ «Ужгородський національний університет».

6. Повнота викладу матеріалу дисертації в опублікованих працях.

Результати досліджень опубліковані у 12 наукових публікаціях, з яких 6 статей у наукових фахових виданнях (1 стаття у виданні, що входить до наукометричної бази Web of Science, 1 стаття у виданні, що входить до наукометричної бази ScopusQ2), 1 патент України на корисну модель та 6 доповідей у матеріалах конференцій та конгресів.

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

Рукопис роботи Зелениної Оксани Михайлівни складено за загальноприйнятою схемою і вимогами до дисертацій. Дисертація містить анотації, список публікацій здобувача, вступ, огляд літератури, розділ матеріалів та методів, сім розділів власних спостережень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки та списку використаних джерел, що містить 270 найменувань, оформлених згідно вимог. Дисертація викладена на 187 сторінках, основний обсяг дисертації 165 сторінок.

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 основні використання нанотехнологій для створенням нових антибактеріальних препаратів, функціональний стан організму за їх введення.

У розділі 2 «Матеріал і методи» автор подає об'єкти і передумови досліджень, схему досліджень та опис комплексу застосованих сучасних методик -, біохімічних, фізичних. інструментальних, статистичних.

Розділ 3 дисертантка присвятила дослідженню антимікробної активності антибіотика енрофлосацину у традиційній і пегельованій формах на музейних штаммах мікроорганізмів. Для вивчення антимікробної дії досліджуваних препаратів визначали мінімальну інгібуючу концентрацію до еталонних музейних штамів (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 11105) та польових (*Streptococcus epidermidis*, *Enterobacter*) мікроорганізмів. Встановлено, що до *Escherichia coli* ATCC 11105 МІК за дії пегельованого антибіотика енрофлосацину є удвічі нижчою (0,15 мкг/мл), порівняно з традиційною субстанцією (0,31 мкг/мл).

В розділі 4 здобувач проаналізувала результати гематологічних показників щурів за введення пегельованого та традиційного антибіотиків енрофлосацину і ПЕГ-400. Показано, що внутрішньом'язові ін'єкції антибіотика енрофлосацину у традиційній формі, нанополімеру ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлосацину не спричиняють патологічних змін гемопоезу у щурів (показники кількості еритроцитів, вміст гемоглобіну,

величина гематокриту та індексів червоної крові знаходилися у межах фізіологічних коливань). Було з'ясовано, що у тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлосацин, протягом експерименту показники індексів червоної крові були більш стабільними, порівняно з тими, які отримували традиційний антибіотик енрофлосацин.

В розділах 5 та 6 здобувач Зеленіна О.М. проаналізувала представлені експериментальні результати щодо оцінки стану лейкограми та тромбоцитарної ланки гемограми щурів за введення пегельованого та традиційного антибіотика енрофлосацину і ПЕГ-400. Внутрішньом'язове введення щурам нанополімеру ПЕГ-400, антибіотика енрофлосацину у традиційній формі та пегельованого антибіотика енрофлосацину характеризується зниженням числа лейкоцитів через 7-ім діб після останньої ін'єкції, але показники не виходили за межі фізіологічних коливань.

Внутрішньом'язове введення щурам традиційної форми енрофлосацину та нанополімеру ПЕГ-400 спричиняє на 7-му добу після останніх ін'єкцій зниження загальної кількості тромбоцитів, а також тромбокриту за введення ПЕГ-400, при цьому рівень ширини розподілу тромбоцитів був вищим після застосування ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлосацину. У наступні дослідження показники кількості тромбоцитів та їх індекси не відрізнялися між контрольними та дослідними тваринами.

У розділі 7 здобувач провела аналіз стану антиоксидантної системи організму щурів за впливу досліджуваних сполук. Встановлено, що введення тваринам пегельованого антибіотика енрофлосацину не спричиняє надмірного утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів та не викликає негативного впливу на антиоксидантний стан організму.

У розділах 8 та 9 наведено результати досліджень функціонального стану і структури печінки та нирок у щурів за введення пегельованого та традиційного антибіотика енрофлосацину і ПЕГ-400. Дисертанткою на основі результатів біохімічних досліджень крові тварин і гістологічного аналізу тканин печінки та нирок встановлено, що чотирикратні внутрішньом'язові ін'єкції тваринам пегельованого антибіотика енрофлосацину мають короткотривалий та незначний негативний вплив на організм, порівняно з введенням традиційної форми антибіотика енрофлосацину, за впливу якого спостерігалась гепатотоксичність, нефротоксичність.

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

За результатами роботи зроблено 11 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 Зелениної О.М., проте є деякі зауваження:

1. Із викладеного матеріалу не зрозуміло, чому на 21 добу після введення лабораторним тваринам енрофлоксацину у пегельованій формі кількість еритроцитів була вищою, ніж у контрольній групі. Як це можна пояснити?
2. Який механізм гальмування ензимів антиоксидантної ланки (СОД, каталази та глутатіонпероксидази) при введенні тваринам енрофлоксацину у пегельованій формі?
3. Як поясните гістологічні зміни тканини нирок лабораторних тварин після введення ПЕГ-400 та енрофлоксацину у пегельованій формі на 7 добу?

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.
Дисертаційна робота Зелениної Оксани Михайлівни «Метаболічні процеси в організмі щурів за дії енрофлоксацину, пегельованого ПЕГ-400» 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 ступення доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44, а її автор, Зеленина Оксана Михайлівна, заслуговує на присудження ступення доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія».

Рецензент:

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

Прийнято до захисту, ст. н. с. Стефанишин О.М.
О. М. Стефанишин
О. Стефанишин



Стефанишин О.М.