

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки, завідувача кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького Воробця Зіновія Дмитровича на дисертаційну роботу Зелениної Оксани Михайлівни на тему: «**Метаболічні процеси в організмі щурів за дії енрофлораксацину, пегельованого ПЕГ-400**», представлену до захисту в разову спеціалізовану вчену раду ДФ35.368.003 Інституту біології тварин НААН, що утворена відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 з правом прийняття до розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 01 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність обраної теми. Хотів би відмітити, що з роботами, які стосуються впливу фторхінолонів на мікроорганізми та з роботами дисертанта добре знайомий. Вважаю цю роботу актуальною як із фундаментальної, так і практичної точки зору. У науково-теоретичному аспекті слід відмітити, що на теперішній час наші уявлення щодо механізму дії фторхінолонів на бактеріальні клітини, їх проникності, ефективності ще далекі від більш-менш завершених. Це значною мірою пов'язано з тим, що мікроорганізми здатні протистояти антибактеріальним препаратам завдяки швидкій еволюції генетичних механізмів, що призводить до формування резистентності. Це зумовлює необхідність переглянути стратегію й тактику застосування антибіотиків. Однією із причин, що знижує ефективність антибіотиків, є недостатня бактеріальна дія внаслідок незадовільного проникнення через клітинні мембрани та, відповідно, низький вміст і активність у патогенних мікроорганізмах.

Серед лікарських препаратів, антибіотики мають найбільш виражені побічні реакції, що обмежує їх використання. Введення в організм антибактеріальних засобів спричиняє побічні дії, які характеризуються ураженням життєво важливих органів і систем. Зокрема, антибіотики

стимулюють клітинне дихання з подальшим прискоренням ендogenous утворення реактивних видів Оксигену, що призводить до розвитку оксидативного стресу. Одними з проявів побічної дії антибіотиків є їх гепатотоксичність та нефротоксичність.

Сьогодні існує необхідність розвитку нових технологій, які дозволяють створювати високоефективні та безпечні антибактеріальні засоби для організму. Однією з найбільш перспективних технологій є розробка сполук лікарських форм антибактеріальних препаратів із полімерами, які виконують функцію носія антибіотиків. Актуальним є розробка таких полімерів, які б забезпечували захист антибіотиків від несприятливих умов навколишнього середовища, стабілізували їх транспортування до органів і тканин, сповільнювали деструкцію та виведення з організму. При цьому, важливим є щоб створені нові антибактеріальні засоби мали добре проникнення у вогнища патологічного процесу, що сприяло б прискоренню одужання. Забезпечення ефективності цільової доставки лікарських засобів призведе до збільшення їх концентрації лише у місці ураження, мінімізуючи загальну токсичну дію на організм. Зокрема, пегелювання є одним з найуспішніших шляхів поліпшення доставки лікарських препаратів. ПЕГ є біодеградабельним і біосумісним, оскільки не утворює токсичних метаболітів, і є комерційно доступним.

Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими програмами. Дисертаційна робота була фрагментом планової наукової програми наукових досліджень НААН 38 «Наукове забезпечення контролю епізоотичного благополуччя тваринництва та систем біологічної і продовольчої безпеки України» (Епізоотичне благополуччя, біологічна та продовольча безпека) у 2016-2020 рр., у якій виконувалося фундаментальне завдання 38.01.06.05 Ф «Розроблення методології та теоретичних основ лікування і профілактики пріонних інфекцій шляхом створення препаратів нового покоління з

використанням нанотехнологій» № ДР 0117U001417 і Програми наукових досліджень НААН 34. «Забезпечення стабільного епізоотичного благополуччя та продовольчої безпеки України у контексті реалізації стратегії МЕБ-ВООЗ-ФАО «Єдине здоров'я» («Єдине здоров'я, біологічна та продовольча безпека»), у якій виконувалося прикладне завдання 34.01.05.02 П. Вплив препаратів, створених з використанням нанобіополімерних транспортерів-контейнерів, на організм та продуктивність тварин за № ДР 0121U108681 у 2021–2023 рр.

Наукова новизна та достовірність одержаних результатів. На основі ознайомлення з дисертаційною роботою та обговорення з дисертантом ряду наукових положень дисертації, вважаю, що пегелювання антибіотика енрофлорсацину проведено вперше і комплексно досліджено його вплив на мікроорганізми та організм лабораторних тварин. Отримано нові дані щодо дії пегельованого енрофлорсацину на метаболічні процеси в організмі лабораторних тварин і досліджено антибактеріальні властивості, проведено порівняння з традиційним антибіотиком енрофлорсацином і ПЕГ-400, які використовувалися для його створення. Вперше встановлено, що пегелювання енрофлорсацину призводить до покращення його антимікробних властивостей щодо музейних штамів мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105. Водночас, мінімальна інгібуюча концентрація на музейні штами мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P і польові штами грампозитивних (*Staphylococcus 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. Після внутрішньом'язових ін'єкцій пегельованого антибіотика енрофлорсацину незначні зміни показників крові щурів можуть спостерігатися лише у перші доби, а за введення традиційної субстанції антибіотика енрофлорсацину – до 21-ої доби.

Практична цінність одержаних результатів. Проведені дослідження показали, що пегелювання антибіотика енрофлорсацину покращує його антимікробну дію. 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 органічної хімії НУ «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».

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі. Усі узагальнення та висновки, наведені у дисертаційній роботі, ґрунтуються на матеріалах власних досліджень і відображають закономірності, що були

виявлені шляхом аналізу отриманих авторських результатів. Робота виконана на високому методичному рівні із застосуванням сучасних методів досліджень, які є адекватними до поставленої мети та визначених завдань.

Усі отримані результати опрацьовані статистично за допомогою відповідних методів математичної статистики. Ретельний аналіз отриманих результатів дав змогу дисертантці їх узагальнити та зробити висновки. Усі висновки відповідають змісту роботи.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури. Дисертацію викладено на 189 сторінках комп'ютерного тексту (основний зміст 155 сторінок), проілюстровано 47 рисунками та 3 таблицями. Список використаних джерел містить 270 найменувань.

Загальна характеристика роботи. Дисертація містить усі розділи, передбачені Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44. У вступі детально викладені мета і завдання роботи, наукова новизна та практичне значення одержаних результатів, особистий внесок здобувача, апробація результатів роботи, основні положення дисертації та показані методи вирішення поставленої проблеми.

Розділ «Огляд літератури» включає 5 підрозділів, у яких автор приводить і узагальнює дані вітчизняної та іноземної літератури. Описано стан сучасної протимікробної терапії, антибактеріальні властивості фторхінолонів (енрофлоксацин), використання поліетиленгліколю (ПЕГ) при створенні препаратів і функціональний стан організму за введення антибактеріальних препаратів. У кінці даного розділу автор приводить узагальнення та обґрунтування вибору напрямів власних досліджень.

Розділ «Матеріали, методи і схема дослідження» містить напрями, схему, матеріал і методи досліджень. Дослідження проведені за вибраною темою роботи на достатній кількості експериментального матеріалу. Використані методи досліджень проводились на сучасному обладнанні та високому науковому й методичному рівнях, відповідають меті та завданням роботи.

Розділ «Антимікробна активність пегельованого та традиційного антибіотика енрофлораксацину» містить 2 підрозділи. Матеріали, викладені у даному розділі, стосуються результатів вивчення впливу пегелювання антибіотика енрофлораксацину на його антимікробну активність. Для вивчення антимікробної дії досліджуваних препаратів було визначено мінімальну інгібуючу концентрацію до еталонних музейних штамів (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 11105) та польових (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter*) мікроорганізмів, останні виділені з носових виділень та з верхніх дихальних шляхів телят, хворих на бронхопневмонію.

Розділ «Гематологічні показники щурів за введення пегельованого та традиційного антибіотика енрофлораксацину і ПЕГ-400» містить 4 підрозділи та 4 підпідрозділи. У розділі досліджено гематологічні показники крові щурів за введення традиційної та пегельованої форми антибіотика енрофлораксацину. Доведено, що внутрішньом'язові ін'єкції в організм щурів антибіотика енрофлораксацину у традиційній формі, ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлораксацину не спричиняють патологічних змін гемопоезу, оскільки показники кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну, а також величина гематокриту та індексів червоної крові знаходилися у переважної більшості тварин у межах фізіологічних коливань.

Розділ «Кількість лейкоцитів, лейкограма та швидкість осідання еритроцитів крові щурів за введення пегельованого та традиційного

антибіотика енрофлорсацину і ПЕГ-400» містить 2 підрозділи. Автором було досліджено загальну кількість лейкоцитів, розраховано мікроскопічним методом лейкограму та визначено швидкість осідання еритроцитів за введення традиційного та пегельованого енрофлорсацину.

Показано, що внутрішньом'язове введення щурам ПЕГ-400, антибіотика енрофлорсацину у традиційній формі та пегельованого антибіотика енрофлорсацину характеризується зниженням числа лейкоцитів через сім діб після останньої ін'єкції, але показники не виходили за межі фізіологічних коливань.

У розділі *«Кількість тромбоцитів крові щурів та їх індекси за введення пегельованого та традиційного антибіотика енрофлорсацину і ПЕГ-400»* міститься 2 підрозділи та 3 підпідрозділи. Досліджено загальну кількість тромбоцитів та тромбоцитарні індекси. Показано, що внутрішньом'язове введення щурам традиційної форми енрофлорсацину та 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 енрофлорсацину. У наступні дослідження показники кількості тромбоцитів та їх індекси не відрізнялися між контрольними та дослідними тваринами.

У розділі *«Стан антиоксидантної системи у крові щурів за введення пегельованого та традиційного антибіотика енрофлорсацину і ПЕГ-400»* міститься 4 підрозділи. Автором доведено, що пегелювання антибіотика енрофлорсацину призводило до стабілізації у крові вмісту ТБК-активних продуктів, а також активності СОД, каталази та ГПО, що слід розцінювати як гальмування процесів ПОЛ і фізіологічність перебігу антиоксидантного захисту організму.

У розділі «Функціональний стан і структура печінки у щурів за введення пегельованого та традиційного антибіотика енрофлораксацину і ПЕГ-400» міститься 14 підрозділів. Біохімічні дослідження крові тварин і гістологічний аналіз тканин печінки вказували, що пегельований антибіотик енрофлораксацин мав меншу гепатотоксичність, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлораксацину.

У розділі «Функціональний стан і структура нирок у щурів за введення пегельованого та традиційного антибіотика енрофлораксацину і ПЕГ-400» міститься 2 підрозділи. Автором визначено вміст креатиніну у сироватці крові та гістологічно досліджено тканини нирок. Доведено, що пегелювання антибіотика енрофлораксацину веде до зменшення нефротоксичності.

У розділі «Обговорення результатів власних досліджень» проведено глибокий, всебічний аналіз і обговорення одержаних результатів та порівняння їх з даними сучасної наукової літератури. Цей розділ написаний лаконічно і професійно та характеризує дисертанта як підготовленого й високоерудованого науковця. Висновки дисертації ґрунтуються на результатах експериментальних досліджень, містять цифровий матеріал.

Наявність академічного плагіату не виявлено.

Відповідність дисертації встановленим вимогам. Зміст проведених здобувачем наукових досліджень відповідає паспорту спеціальності 091 «Біологія». Робота виконана на належному рівні та відповідає Постанові Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 року, № 44 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» зі змінами, внесеними згідно з Постановою КМ № 341 від 21.03.2022 року та Наказу МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» №40 від 12.01 2017 року.

Повнота викладення основних положень дисертації в опублікованих працях. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 12 працях, зокрема 4 статтях, з яких 2 у фахових наукових виданнях України, що входять до категорії Б, 1 – у зарубіжному виданні, яке включене до міжнародної бази даних «Web of Science» та 1 – у зарубіжному виданні, яке включене до міжнародної бази даних Scopus (Q2), а також у 7 тезах доповідей матеріалів наукових міжнародних і вітчизняних конференцій та конгресів. Авторкою отримано один патент на корисну модель.

Зауваження та запитання, які виникли при аналізі дисертаційної роботи.

1. У дисертації немає посилань на роботи Коваленко І.В., в якій вивчалась антибактеріальна активність фторхінолонів II, III і IV поколінь, зокрема ципрофлоксацину, левофлоксацину і моксифлоксацину, а також їх вплив на пероксидацію ліпідів та активність ензимів глутатіонової ланки антиоксидантної системи.
2. У роботі недостатньо описана побічна дія фторхінолонів. Описується тільки функціональний стан організму за введення антибактеріальних препаратів.
3. Чому обрали для досліджень *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* ?
4. Чому в експерименті використано поліетиленгліколь з молекулярною масою 400 Да?
5. Як пояснити зниження інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів за введення пегельованого енофлоксацину?
6. Чому використовували антибіотик енофлоксацин?
7. Чому пегельований енофлоксацин має більшу проникну здатність до бактеріальних клітин, порівняно з традиційною формою антибіотика?

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Зелениної Оксани Михайлівни «Метаболічні процеси в організмі щурів за дії енрофлораксацину, пегельованого ПЕГ-400» є закінченою науковою працею, виконана автором на високому методичному рівні, достатньому обсязі матеріалу, дослідження доповнюють ряд теоретичних положень і можуть бути використані на практиці.

Вважаю, що дисертаційна робота Зелениної О.М. за актуальністю обраної теми, науковою новизною, рівнем методичного підходу, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів, ступенем обґрунтованості та вірогідності положень і висновків повністю відповідає Постанові Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 із змінами, внесеними згідно з Постановою КМ № 341 від 21.03.2022 р., а її автор заслуговує присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
лауреат Державної премії України
в галузі науки і техніки,
завідувач кафедри медичної біології,
паразитології та генетики
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького



Зіновій ВОРОБЕЦЬ

Засвідчую _____

Провідний фахівець
відділу кадрів
ЛМНУ ім. Данила Галицького