

ВІДГУК

офіційного опонента кандидата біологічних наук,
доцента Домбровської Ірини Володимирівни
на дисертацію Дудікової Дар'ї Маратівни «Антимікробні властивості
четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-
пропанолу», подану до спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Найвагомішим фактором неефективного лікування інфекційних хвороб є поширення антибіотикорезистентності мікроорганізмів. В усьому світі резистентність до антибіотиків є проблемою, яка загострюється з кожним роком (Septimus E.J., 2018).

Виникнення антибіотикостійкості у грампозитивних бактерій, зокрема метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), серйозно зменшує кількість емпіричних агентів для показань до лікування. Збільшення антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій також негативно позначилося на альтернативах лікаря при виборі адекватної початкової терапії, призвело до посилення залежності від групи карбапенемів.

Розробка нових хіміопрепаратів має глобальне значення і має бути стійкою та посиленою, оскільки ко-селекція мікроорганізмів продовжуватиметься безперервно, а резистентність до лікарських засобів формується як результат адаптацій та преадаптацій (Global action plan on antimicrobial resistance, WHO, 2015). Експерти Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних хвороб попередили, що за відсутності коштів на розробку нових лікарських засобів та нормування існуючих запасів, Європу чекає "Antibiotic Armageddon" 2025 року (ESCMID, 2016).

Перегляд хіміотерапії інфекційних хвороб стратегічно зорієнтований на створення новітніх засобів стримування та знешкодження інфектів, проте тактика модифікації сполук, що вже мають досвід медичного застосування, значно прискорює темпи оновлення арсеналу антимікробних препаратів.

Класом сполук, що з цих позицій заслуговують на увагу, є четвертинні солі 1-[-4-(1-адамантил)-феноксид]-3-діалкіламіно-2-пропанолу. Актуальним є скринінг серед них найбільш активних та безпечних сполук, оцінка спектру потенційної антимікробної дії та з'ясування її основних механізмів.

Зв'язок теми дисертації з науковими державними та галузевими програмами і планами. Дисертація є фрагментом планових науково-дослідних робіт відділу фармакології протимікробних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» «Дослідження механізму антимікробної дії похідних аміноадамантану» (№ державної реєстрації 0109U002115) і «Дослідження впливу аміноспиртів з адамантильним або N-алкіларильним радикалом на процеси плівкоутворення монокультур бактерій, грибів та мікробних асоціацій» (№ державної реєстрації 0115U002442).

Основний зміст дисертації та його оцінка. Дисертацію викладено за традиційною схемою на 257 сторінках комп'ютерного тексту, з яких 196 сторінок основного тексту. Робота містить анотацію, список друкованих праць за темою дисертації, зміст, перелік умовних позначень, символів, одиниць вимірювання, скорочень, вступ, огляд літератури (розділ 1), опис матеріалів і методів дослідження (розділ 2), 4 розділи власних досліджень (розділи 3-6), аналіз та узагальнення результатів, висновки, список джерел літератури (255 найменувань, з яких 89 – кирилицею, 166 – латиницею); ілюстрована 43 таблицями та 35 рисунками. Таким чином, структура та обсяг рукопису відповідають вимогам до кандидатських дисертацій.

Базові розділи дисертації – Огляд літератури та Матеріали та методи дослідження – оформлені згідно з вимогами і містять змістовну інформацію відповідно про стан проблем антимікробної терапії та схему скринінгу протимікробних засобів з врахуванням вимог безпеки їх застосування, ефективності за різних чинників, форм запальних процесів та для різних станів мікробних популяцій. Методична база дисертаційної роботи охоплює сучасні фармакологічні, мікробіологічні, біохімічні, фізико-хімічні,

електронно-мікроскопічні методи досліджень.

За результатами дослідження слід вважати вельми успішним скринінг четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу за активністю проти грампозитивних бактерій та дріжджоподібних грибів (18 сполук з 19). Очікуваним є відсутній вплив більшості цих сполук на грамнегативні бактерії, проте сполука KBM-97 виявляла дію навіть на *P. aeruginosa* (МІК 2,5 мкг/мл). Водночас ця сполука була здатна діяти на грампозитивні бактерії в діапазоні МІК 0,3–5,0 мкг/мл, на молікути в діапазоні МІК 1,56–12,5 мкг/мл та на гриби в діапазоні МІК 0,3–2,5 мкг/мл. Друга з найактивніших сполук ЮК-23 характеризувалася виразною активністю щодо грампозитивних бактерій (МІК 0,15–2,5 мкг/мл), молікунів (МІК 3,12–6,25 мкг/мл), дріжджоподібних (МІК 0,07–0,6 мкг/мл) та міцеліальних грибів (МІК 0,3–2,5 мкг/мл), менш чутливими виявились грамнегативні мікроорганізми (МІК 10,0–> 50,0 мкг/мл).

Важливо також зазначити, що за рівнями активності обрані сполуки не поступалися сучасним природним та напівсинтетичним антибіотикам та синтетичним хіміопрепаратам, таким як ванкоміцин, азитроміцин, ампіцилін, цефтазидим, меропенем, лінезолід.

Про широту спектру антимікробної активності відібраних сполук свідчать результати їх поглиблених досліджень.

Відносно тест-штамів анаеробних бактерій *Clostridium* spp. МІК сполук знаходиться у межах 0,35–1,25 мкг/мл, що переважає активність метронідазолу, кліндаміцину та ампіциліну-сульбактаму (МІК \leq 4,0 мкг/мл).

Залежно від тест-штаму дріжджоподібних грибів досліджувані сполуки переважають або не поступаються за значенням МІК флуконазолу (МІК \leq 2,0 мкг/мл, окрім *C. glabrata*) та амфотерицину В (МІК \leq 1,0 мкг/мл).

Досліджувані адамантанвмісні сполуки є активними щодо збудників зигомікозів (*M. circinelloides*), фузаріозів (*F. oxysporum*) та аспергільозів (*A. niger*), МІК становить 0,3–2,5 мкг/мл. За значенням МІК сполуки ЮК-23

та КВМ-97 не поступаються або наближаються до активності амфотерицину В та представників азолів – вориконазолу та позаконазолу.

Численні з медичної практики факти утворення біоплівки патогенними бактеріями та дріжджоподібними грибами зумовили важливий етап дослідження адамантанвмісних сполук на модельні біоплівки.

Результати дослідження антибіоплівкових властивостей свідчать, що сполука КВМ-97 у діапазоні концентрацій 0,5–5,0 МІК здатна пригнічувати плівкоутворення і руйнувати сформовані біоплівки бактерій (*P. aeruginosa*) та грибів (*C. glabrata*), а також попереджувати колонізацію засобів медичного призначення, що підтверджено на катетерній моделі. В експериментах на катетерній моделі встановлено, що сполука КВМ-97 порушує адгезію мікроорганізмів до поверхні катетера та плівкоутворення, що запобігатиме розвитку катетер-асоційованих інфекцій. Антибіоплівкова активність зростала зі збільшенням концентрації сполуки.

Одержані в дослідіах *in vitro* результати стали підґрунтям для наступних етапів роботи, здійснених *in vivo*.

Ефективність сполуки КВМ-97 була доведена на моделі генералізованої інфекції та місцевого гнійно-запального процесу. При введенні сполуки КВМ-97 тваринам з генералізованою інфекцією, обумовленою *P. aeruginosa*, в дозі 0,01 ЛД₅₀, 100 % інфікованих тварин виживали. Такий ефект можна порівняти з ефективністю меропенему. При такій же дозі та режимі введення на моделі кандидемії сполука КВМ-97 сприяла виживанню 30 % тварин при 100 % загибелі у контролі.

Доведено ефективність КВМ-97 у вигляді 0,025 % розчину на моделі стафілококового кон'юнктивіту у кролів. Повне зникнення симптомів захворювання реєстрували на четверту добу, у тварин контролю – після дванадцятої доби. Експериментально встановлено, що за ефективністю на моделі стафілококового кон'юнктивіту сполука КВМ-97 практично не поступався тобраміцину та сульфацилу натрію.

Важливо, що ці експерименти супроводжувались оцінкою гострої токсичності та місцевопоздразнювальної дії сполук. Встановлено, що найактивніші сполуки з 19 досліджених відносяться до малотоксичних (IV клас) та помірно небезпечних речовин (III клас), залежно від шляху введення. Сполука КВМ-97 не чинить місцевопоздразнювальну дію при нанесенні на слизову оболонку ока тварин у концентраціях нижче 0,025 %.

Використання електронної мікроскопії дозволило встановити суттєві зміни ультраструктури клітин тих бактерій та грибів, що входять до спектру дії сполук КВМ-97 та ЮК-23. Експозиція клітин *P. aeruginosa* впродовж 1 год зі сполукою КВМ-97 у концентраціях 0,5 МІК та 2,0 МІК призводила до множинних інвагінацій клітинної стінки, якщо за впливу 0,5 МІК ще спостерігались гранули волютину в клітинах, то при 2,0 МІК вони зникали. Подібна закономірність впливу різних концентрацій сполук КВМ-97 стосувалася позаклітинних везикул. Інкубація клітин зі сполукою КВМ-97 впродовж 6 год супроводжувалася дозозалежним збільшенням конденсації цитоплазми. За концентрації 2,0 МІК в окремих клітин реєстрували зменшення периплазматичного простору. Усі названі клітинні структури є цитологічними маркерами, за якими визначають нормальний або дефектний стан клітини. Тому отримані результати слід вважати вельми вагомими.

Таким чином, проведене дослідження впливу сполуки КВМ-97 на ультраструктуру клітин *P. aeruginosa* дозволяє простежувати динаміку деструкції клітин в залежності від тривалості дії сполуки та її концентрації.

Суттєві зміни ультраструктури клітин *S. aureus* були зафіксовані за дії сполуки ЮК-23 вже через 1 год впливу та посилювалися зі збільшенням часу експозиції зі сполукою. Клітинна стінка стафілокока зберігала будову характерну для інтактних (контрольних) клітин, натомість цитоплазматична мембрана локально відокремлювалася від компонентів цитоплазми або утворювали чисельні інвагінації. Ефект дії речовини посилювався із часом, через 24 години експозиції зі сполукою ЮК-23 відмічали поліморфізм клітин та їх лізис.

Цікавим, хоч і не зовсім однозначним, був вплив обох сполук КВМ-97 та ЮК-23 на клітини грибів роду кандіда. Так, сполука КВМ-97 зумовлювала збільшення кількості дефектних мітохондрій, а сполука ЮК-23 сприяла змінам структури клітинної стінки та мембрани.

Таким чином, серед структур клітин як бактерій, так і грибів, зміни яких найчастіше реєстрували під впливом сполук КВМ-97 та ЮК-23, домінували мембранні утворення.

Зміни у складі маркерних сполук зовнішніх мембран грамнегативних бактерій та грибних мембран стали завданням для пошуку на наступному етапі дослідження. Результати досліджень свідчать, що вплив сполуки КВМ-97 на зовнішні мембрани грамнегативних бактерій пов'язаний з кількісними змінами загального полісахаридного складу. Механізм дії сполук КВМ-97 та ЮК-23 на гриби роду кандіда не пов'язаний ані з синтезом стеринів, ані із взаємодією з ними.

Вплив на структуру ЦПМ може бути оцінений за критерієм проникності мембрани, що і було встановлено на клітинах *S. aureus*, *P. aeruginosa* та грибів роду *Candida*. Так, інкубація бактерій та грибів зі сполукою ЮК-23 супроводжувалася поступовим зростанням виходу внутрішньоклітинного вмісту із максимумом при 50,0 МІК. Максимальний вихід ендогенних речовин під впливом КВМ-97 зафіксований в діапазоні від 10,0 МІК (*P. aeruginosa*, *Candida*) до 20,0 МІК (*S. aureus*).

Вплив досліджуваних сполук на транспортні системи мембран було доведено в дослідах з хлорпромазином та бромистим етидієм. Збільшення накопичення бромистого етидію за дії КВМ-97 реєструвалося через 20 хв (близько 50 % від накопиченого в клітині *P. aeruginosa*), при дії хлорпромазину – тільки через 40 хв. Це засвідчило здатність сполуки КВМ-97 змінювати активність ефлюкських помп.

Експерименти з дослідження впливу адамантанвмісних сполук на внутрішньоклітинні процеси базувалися на оцінці вмісту білка, жирнокислотного складу, активності дихання та ферментативних реакцій.

Встановлено зниження вмісту білка в клітинах бактерій на противагу клітинам дріжджів, де його кількість збільшувалась. Порушення складу жирних кислот було пов'язано з субінгібуючою концентрацією (0,5 МІК) сполуки КВМ-97. Ця ж концентрація сполуки знижує активність ендогенного дихання на 20%, в той час як концентрація 1,0 МІК викликає його повне пригнічення в клітинах. Сполука ІОК-23 зумовлює збільшення швидкості субстратного дихання на 20 % у кандід, натомість зниження активності ендогенного дихання на 46%, що може бути обумовлено впливом сполуки на мітохондрії.

Наукова новизна результатів

Вперше докладно охарактеризовано широкий спектр антибактеріальної активності та доведена антикандидозна активність четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-феноксид]-3-діалкіламіно-2-пропанолу.

Вперше доведено високу ефективність найактивнішої сполуки на моделях генералізованої синьогнійною інфекції, а також за місцевого застосування при стафілококовому кон'юнктивіті. Новими є результати досліджень на катетерній моделі.

Електронно мікроскопічні дослідження дозволяють наблизитися до встановлення механізму дії сполук. Хоча поки що конкретну молекулярну мішень визначити важко, зібрані докази вказують на мембранотропну дію досліджуваних сполук.

Водночас, суттєвим доповненням електронно мікроскопічних досліджень стали експерименти з оцінки функціонування мембран бактерій та грибів, яке залежить від маркерних сполук (полісахариди грамнегативних бактерій, стерини грибів). Вагомим аргументом впливу на мембрани є оцінка активності ефлюксних помп.

Важливою складовою функціонування мембрани є активність дихального ланцюга, процесів, відповідальних за енергозабезпечення і функціонування мікробної клітини в цілому. Встановлено, що досліджувані

сполуки можуть впливати на дихання клітин мікроорганізмів, активність ферментів, пов'язаних з енергетикою клітини.

Маркерами дії досліджуваних сполук можна вважати порушення ліпідного обміну, зміни вмісту білка, проте таких аргументів недостатньо для доведення патології внутрішньоклітинних процесів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що її результати експериментально обґрунтовують перспективність сполук четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу як основи нових антибактеріальних та антифунгальних засобів. Крім того, результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес 6 кафедр фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Харківського національного медичного університету, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Запорізького державного медичного університету.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Всі наукові положення та висновки дисертації є обґрунтованими та достовірними, лише деякі мають не однозначне трактування. Це є результатом стандартизації умов експерименту, суворого дотримання чинних методичних рекомендацій та використання сучасних статистичних методів.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях і в авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 19 робіт, з яких 7 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 стаття у закордонному рецензованому виданні, 9 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій різного рівня, у тому числі з міжнародною участю, 1 патент України на винахід та 1 патент України на корисну модель.

Зауваження та питання:

1. Некоректним є довільне використання назв цитологічних структур, зокрема клітинна оболонка, на заміну назв клітинна стінка та мембрана.
2. Назва цитологічної структури глікокалікс використовується стосовно тваринних клітин. Про який глікокалікс йдеться в структурі клітин *P. aeruginosa*?
3. Бета-лактази розширеного спектру та карбапенемази належать до різних класів бета-лактамаз.
4. Незрозуміло з електронних фото, яка власне структура клітинна стінка чи мембрана клітин грибів роду *Candida* зазнає безпосереднього впливу сполуки ЮК-23.
5. Не достатньо показовими є зміни стану мітохондрій в дріжджових клітинах в умовах електронно-мікроскопічного дослідження впливу сполуки КВМ-97.
6. Яка природа полярних тілець в клітинах *P. aeruginosa*?
7. Чому при вивченні дії досліджуваних сполук на грампозитивні бактерії препаратами порівняння обрані ванкоміцин та тетрациклін?
8. Наскільки показовим є вміст білка як критерій оцінки змін внутрішньоклітинних процесів?

Ці зауваження і питання мають рекомендаційний та дискусійний характер і не зменшують високу оцінку дисертації Д.М. Дудікової.

Висновок про відповідність дисертації представленим вимогам
Дисертація Дудікової Дар'ї Маратівни «Антимікробні властивості четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 (фармакологія) є закінченою науково-дослідною роботою.

Все вищезазначене дозволяє дійти висновку, що дисертація Дудікової Дар'ї Маратівни «Антимікробні властивості четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу» за актуальністю, методичним рівнем, об'ємом досліджень, науковим та практичним значенням відповідає вимогам до кандидатських дисертацій, викладеним у п.11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 із змінами згідно з Постановою КМ № 656 від 19.08.2015 р.

Дудікова Дар'я Маратівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Офіційний опонент
доцент кафедри мікробіології та
імунології ННЦ «Інститут біології та медицини»
КНУ імені Тараса Шевченка,
к.б.н

І.В.Домбровська

Підпис доцента кафедри мікробіології
та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини»
КНУ імені Тараса Шевченка, к.б.н Домбровської І.В.
засвідчую

заступник директора ННЦ «Інститут біології та медицини»
ННЦ «Інститут біології та медицини»
к.б.н



Т.А.Компанець