

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувачки відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України Авдєєвої Лілі Василівни на дисертаційну роботу на дисертаційну роботу Гуменюк Наталії Ігорівни на тему: «Фармакодинамічні особливості антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу», представлену до захисту у разову спеціалізовану Вчену раду PhD 11540 на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність теми. Дисертаційна робота Гуменюк Наталії Ігорівни присвячена пошуку нових ефективних та безпечних лікарських засобів з антибіоплівковою активністю на основі сполук з адамантильним радикалом. Актуальність обраної теми не викликає сумнівів, адже значне поширення антибіотикорезистентних штамів становить серйозну проблему, призводить до неефективності антимікробної хіміотерапії у пацієнтів з інфекційними захворюваннями, збільшення тривалості лікування, матеріальних витрат, ризику ускладнень та летальності хворих. Особливо небезпечними збудниками запальних процесів є мікроорганізми, які характеризуються високою патогенністю, стійкістю до широкого спектра антимікробних засобів та здатністю до формування біоплівок. Як відомо, саме біоплівкові форми мікроорганізмів спричиняють до 80 % хронічних інфекцій, значна частина яких припадає на пристрій-асоційовані захворювання, а особливості структури біоплівок забезпечує здатність бактерій виживати за дії високих доз антимікробних препаратів та уникати впливу імунної системи організму людини.

Одним із шляхів підвищення ефективності антибіотикотерапії у пацієнтів з інфекціями, асоційованими з біоплівками, є дослідження здатності нових перспективних сполук запобігати плівкоутворенню та руйнувати сформовані біоплівки бактерій. У дисертаційній роботі представлені результати окремих аспектів механізму антибіоплівкової активності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на різних етапах плівкоутворення грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Вибір досліджуваних речовин обґрунтований тим, що адамантавмісні сполуки характеризуються широким спектром біологічної активності, включаючи і антимікробну, а використані у роботі види бактерій віднесені до переліку пріоритетних для створення нових антимікробних засобів.

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

Дисертація Гуменюк Н. І. виконана відповідно до наукової тематики лабораторії фармакології протимікробних засобів відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»: «Вивчення особливостей формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ держреєстрації 0121U109291) та «Механізми антибіоплівкової активності похідних адамантану» (№ держреєстрації 0118U001559).

Наукова новизна досліджень. Уперше експериментально комплексно оцінено механізм антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій. Поглиблено наукові уявлення про антимікробну активність адамантанвмісних сполук, зокрема їх вплив на плівкоутворення та сформовані біоплівки грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами.

Уперше встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу – (4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензол (АМ-166) та 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанолу хлорид (КВМ-97) впливають на неспецифічні та специфічні фактори адгезії, порушують формування біоплівки. На моделі хірургічної шкірної рани у щурів, інфікованої мікст-збудниками (*S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*), сполука КВМ-97 виявляє антиадгезивні властивості у лікувально-профілактичному та лікувальному режимі, забезпечуючи зниження мікробної контамінації на поверхні та у глибині рани.

Уперше молекулярно-генетичними методами доведено, що порушення плівкоутворення пов'язано зі зміною транскрипційної активності генів, що регулюють синтез білків-адгезинів (*clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS*, *eno*) та генів *icaADBC*-оперону, відповідальних за плівкоутворення, міжклітинну адгезію, синтез компонентів матриксу у *S. aureus*, генів *fliC*, *motB*, *fimA*, що забезпечують рухливість, адгезію до субстрату клітин *E. coli*. Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу змінюють експресію генів, що регулюють синтез полісахаридних компонентів матриксу біоплівки (*pelA*, *pslA*, *algD*, *algL*, *algR*, *algU*, *mucA*) у *P. aeruginosa*.

Уперше встановлено, що сполуки з адамантильним радикалом впливають на QS-залежні процеси, відповідальні за формування біоплівки та синтез факторів вірулентності у *P. aeruginosa*, експресія генів *lasI*, *lasR* Las-системи, *rhlR* Rhl-системи та *pqsR* Pqs-системи у *P. aeruginosa* змінюється. Встановлено, що сполуки АМ-166 та КВМ-97 пригнічують продукцію алкалін металопротеїнази, екзоферменту S, екзотоксину А (зменшення

експресії генів *aprA*, *exoS*, *exoA*), впливають на продукцію піоціаніну та гемолізину.

Доповнено наукові дані про здатність адамантавмісних сполук порушувати енергетичні процеси в клітинах бактерій, зокрема їх здатність впливати на експресію генів *appB*, *appX* (синтез субодиниці цитохрому bd-II дихального ланцюга) і *malP*, *malZ* (катаболізм глікогену) та пригнічувати активність ефлюксних pomp. Встановлено, що порушення активності RND pomp реалізується змінами транскрипційної активності генів *texB*, *texY*, *oprM*, *texR*.

Практичне значення отриманих результатів. Експериментально обґрунтовано перспективність та доцільність розробки нових антимікробних препаратів з антибіоплівковою активністю на основі похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, що підтверджено нововведенням (КПКВ-6561040 «Похідне адамантану 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанолу хлорид для профілактики інфікування ран та формування біоплівки», Інформаційний Бюлетень НАМН України, вип. 51, 2021 р.). Впровадження в медичну практику ефективного та безпечного засобу на основі KBM-97 чи AM-166 підвищить ефективність лікування пацієнтів з інфекційними процесами бактеріального генезу, зокрема спричинених біоплівками. Отримані в експериментах результати щодо механізму антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу дадуть можливість раціонально застосовувати антимікробні препарати, створені на їх основі.

Окремі результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр фармакології Національного фармацевтичного університету (протокол № 5 від 07.11.2023 р.); Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського (протокол № 12 від 31.10.2023 р.), Дніпровського державного медичного університету (протокол № 4 від 10.11.2023 р.), Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 13 від 20.11.2023 р.), Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (протокол № 4 від 10.11.2023 р.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність.

Дисертаційна робота виконана на належному науковому рівні. Використані методи дослідження відповідають поставленим задачам, а отримані результати розкривають суть теми та мети роботи. Висновки логічно побудовані та аргументовані. Наукові положення та рекомендації,

представлені у дисертації, ґрунтуються на результатах аналізу проведених експериментів, є обґрунтованими та достовірними.

Повнота викладу отриманих результатів дисертації в опублікованих працях. Матеріали дисертаційної роботи опубліковані в 11 статтях (8 – у фахових виданнях України, 5 – у журналах, включених до наукометричної бази Scopus - Q2, Q4, 2 – у наукових виданнях іноземних держав), 13 тезах доповідей та 1 нововведенні, включеному до Інформаційного Бюлетеня НАМН України. Наукові праці у повному обсязі відображають зміст дисертаційної роботи.

Зміст та структура дисертації, її завершеність. Робота Гуменюк Н. І. складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів з власними отриманими експериментальними даними, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертація містить 48 рисунків та 15 таблиць.

У вступній частині дисертант обґрунтовує актуальність роботи, зазначає мету, завдання, об'єкт, предмет і методи дослідження. Також формулює наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, описує особистий внесок, інформацію про апробацію матеріалів дисертації, її структуру та обсяг.

Перший розділ *«Біоплівки та хронічні інфекції. Проблеми антимікробної хіміотерапії при біоплівкових інфекціях та шляхи їх вирішення»* присвячений огляду літератури щодо значення біоплівок у розвитку інфекційних процесів, описано особливості процесу їх формування та механізмів стійкості до антимікробних засобів, зазначено проблеми лікування інфекцій, пов'язаних з біоплівками, та стратегії підвищення ефективності антимікробної терапії у пацієнтів з такими захворюваннями.

У другому розділі *«Матеріали та методи дослідження»* представлено хімічні формули сполук та перелік тест-штамів, використаних у дослідженнях. Описано методи дослідження, які застосовувалися у роботі для досягнення поставленої мети.

У третьому розділі *«Плівкоутворення грампозитивних та грамнегативних бактерій за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу»* представлені результати впливу адамантавмісних сполук на плівкоутворення бактерій (метицилін-резистентного *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) в експериментах *in vitro*, дані щодо окремих аспектів механізму їх антибіоплівкової дії на перших етапах формування біоплівок (вплив на специфічні та неспецифічні фактори адгезії, формування персистерів),

описано результати досліджень *in vivo* щодо антиадгезивних властивостей сполук та їх антимікробної активності на засобах медичного призначення.

У четвертому розділі «Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на сформовані біоплівки грампозитивних та грамнегативних бактерій» наведено результати власних досліджень впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на попередньо сформовані біоплівки грампозитивними та грамнегативними бактеріями, компоненти матриксу біоплівок та проникність досліджуваних речовин через матрикс мікробних угруповань.

У п'ятому розділі «Дослідження впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на експресію генів у бактерій» відображені результати молекулярних досліджень щодо змін експресії ключових генів плівкоутворення у метицилін-резистентного *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa* за дії адамантанвмісних сполук.

Шостий розділ «Антивірулентні властивості похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу» присвячений результатам вивчення впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на систему Quorum sensing та QS-залежні клітинні процеси.

У розділі «Узагальнення результатів дослідження» висвітлено порівняння основних результатів роботи з даними літератури та описано можливі механізми отриманих ефектів.

Висновки дисертації чітко сформульовані та відповідають поставленим задачам дослідження.

У додатках наведені структурні та хімічні формули досліджуваних похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, список публікацій здобувача, апробація результатів роботи, акти впровадження та нововведення.

Дисертаційна робота логічно побудована, викладена державною мовою у науковому стилі та оформлена відповідно до чинних вимог (наказ МОН № 40 від 12.01.2017 р.). До кожного розділу з результатами власних досліджень наведені висновки, які чітко узагальнюють представлений у ньому матеріал. Ознак порушення принципів академічної доброчесності у роботі не виявлено.

Вважаю, що дисертація Гуменюк Н. І. добре структурована, має достатній обсяг проведених досліджень та є завершеною науково-дослідною працею.

Дискусійні положення та зауваження до дисертації. Незважаючи на високу оцінку дисертаційної роботи, виникли певні зауваження:

1. У деяких місцях дисертаційної роботи зустрічається дублювання інформації, друкарські, стилістичні помилки, а також завеликі речення з декількома вставними, які утруднюють сприйняття інформації.

Запитання до дисертанта, що потребують додаткового роз'яснення:

1. Чому в експериментах *in vivo* використано 0,05 % розчин сполуки KBM-97? Чому не наведено результати дослідження іншої сполуки AM-166?

2. Які лікарські форми можуть бути розроблені на основі досліджуваних вами сполук?

3. Чому антивірулентні властивості похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу досліджували лише щодо штаму *P. aeruginosa*, адже у роботі представлені результати механізму антибіоплівкової активності сполук щодо трьох штамів бактерій?

Таким чином, дисертація Гуменюк Наталії Ігорівни «Фармакодинамічні особливості антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу» виконана на високому науковому рівні, є самостійною завершеною роботою, відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а дисертант заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

завідувачка відділу антибіотиків

Інституту мікробіології і вірусології

ім. Д. К. Заболотного НАН України,

доктор медичних наук, професор

Лілія АВДЄЄВА