

ВІДГУК

**офіційного опонента, кандидата медичних наук, доцента, доцента
закладу вищої освіти кафедри мікробіології, вірусології та імунології
Полтавського державного медичного університету МОЗ України,
Фаустової Марії Олексіївни**

**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. На сьогодні однією з найбільш складних і актуальних проблем залишається лікування пацієнтів із хронічними інфекційними захворюваннями, зумовленими мікроорганізмами, що формують біоплівки — високоорганізовані мікробні спільноти зі складною просторовою структурою. Такі утворення можуть складатися як з одного, так і з кількох видів мікроорганізмів, які фіксуються на поверхні субстрату та оточені захисним біополімерним матриксом. Мікроорганізми у складі біоплівок характеризуються надзвичайно високою стійкістю до дії антимікробних препаратів, витримуючи концентрації, що у багато разів перевищують мінімальні інгібуючі концентрації для планктонних форм клітин.

Підвищена резистентність плівкових форм бактерій до хіміотерапевтичних препаратів зумовлена низкою взаємопов'язаних механізмів, серед яких ключову роль відіграють особливості організації мікробних спільнот та динаміка їх формування і функціонування. Зокрема, позаклітинний матрикс суттєво обмежує проникнення антимікробних агентів у глибокі шари біоплівки, а гетерогенність метаболічної активності клітин, горизонтальний перенос генів резистентності, функціонування систем міжклітинної комунікації типу *quorum sensing* та активність ефлюкських помп додатково підсилюють захисні властивості біоплівок. У сукупності ці чинники значно знижують ефективність стандартної антимікробної терапії при біоплівкових інфекціях і зумовлюють нагальну потребу в пошуку нових перспективних сполук, здатних впливати на різні стадії формування біоплівок та механізми розвитку антибіотикорезистентності.

Дисертаційне дослідження Гуменюк Н. І. спрямоване на вивчення фармакодинамічних особливостей антибіоплівкової дії сполук, що містять адамантильний радикал, щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій. Актуальність обраної тематики зумовлена масштабністю проблеми

біоплівкових інфекцій і зростаючим інтересом наукової спільноти, що підтверджується значною кількістю публікацій, присвячених пошуку та дослідженню нових антибіоплівкових агентів серед різних класів природних і синтетичних речовин, а також поглибленому вивченню біологічної активності адамантвмісних сполук.

Зв'язок роботи з науковими темами, планами, програмами. Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт лабораторії фармакології протимікробних засобів відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»: «Вивчення особливостей формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ держреєстрації 0121U109291) та «Механізми антибіоплівкової активності похідних адамантану» (№ держреєстрації 0118U001559), співвиконавицею яких є здобувачка.

Наукова новизна досліджень. У ході дослідження вперше проведено всебічний експериментальний аналіз механізмів антибіоплівкової активності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо представників грампозитивної та грамнегативної мікробіоти. Отримані результати суттєво розширюють сучасні уявлення про антимікробні властивості адамантанвмісних сполук, зокрема їхню роль у пригніченні процесів утворення біоплівок і дестабілізації вже сформованих мікробних плівкових структур.

Уперше доведено, 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) — здатні впливати як на неспецифічні, так і на специфічні механізми адгезії мікроорганізмів, унаслідок чого порушується ініціація та подальший розвиток біоплівки. На експериментальній моделі хірургічної шкірної рани у щурів, інфікованої асоціацією збудників (*S. aureus*, *P. aeruginosa* та *C. albicans*), сполука КВМ-97 проявила виражену антиадгезивну дію як у профілактично-лікувальному, так і в лікувальному режимах, забезпечуючи істотне зменшення мікробного заселення поверхневих і глибоких тканин рани.

Із застосуванням молекулярно-генетичних підходів уперше встановлено, що інгібування плівкоутворення пов'язане зі змінами транскрипційної активності генів, відповідальних за синтез адгезивних білків (*clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS*, *eno*), а також генів *icaADBC*-оперону, які контролюють міжклітинну адгезію та утворення матриксу біоплівки у *S. aureus*. Аналогічно зафіксовано зміну експресії генів *fliC*, *motB* і *fimA*, що визначають рухливість та адгезивні властивості клітин *E. coli*. Показано також, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу модулюють експресію генів *pelA*, *pslA*, *algD*, *algL*,

algR, *algU* та *mucA*, залучених до біосинтезу полісахаридних компонентів матриксу біоплівки у *P. aeruginosa*.

Уперше встановлено вплив адамантильних сполук на *quorum sensing*-залежні механізми, що регулюють формування біоплівок і синтез факторів патогенності у *P. aeruginosa*. Зокрема виявлено зміни експресії генів *lasI* і *lasR* (Las-система), *rhlR* (Rhl-система) та *pqsR* (Pqs-система). Доведено, що сполуки АМ-166 і КВМ-97 знижують продукцію алкаліної металопротеїнази, екзоферменту S та екзотоксину А, що супроводжується зменшенням експресії генів *aprA*, *exoS* та *exoA*, а також впливають на синтез піоціаніну та гемолізину.

Отримані дані доповнюють наукові уявлення про здатність адамантвмісних сполук порушувати енергетичний метаболізм бактеріальних клітин. Зокрема встановлено їхній вплив на експресію генів *appB* і *appX*, які беруть участь у синтезі субодиниць цитохрому bd-II дихального ланцюга, а також генів *malP* і *malZ*, відповідальних за процеси катаболізму глікогену. Крім того, показано пригнічення функціональної активності ефлюксних систем RND-типу, що реалізується через зміну транскрипційної активності генів *mexB*, *mexY*, *oprM* та *mexR*.

Практичне значення отриманих результатів. У ході експериментальних досліджень обґрунтовано наукову та практичну доцільність створення нових антимікробних лікарських засобів з антибіоплівковими властивостями на основі похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу. Перспективність цього напрямку підтверджено відповідним нововведенням (КПКВ-6561040 «Похідне адамантану 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанолу хлорид для профілактики інфікування ран та формування біоплівок», Інформаційний бюлетень НАМН України, вип. 51, 2021 р.).

Очікується, що впровадження в клінічну практику ефективного та безпечного препарату на основі сполук КВМ-97 або АМ-166 сприятиме підвищенню результативності лікування пацієнтів з бактеріальними інфекційними захворюваннями, зокрема тими, що асоційовані з біоплівковими формами мікроорганізмів. Одержані експериментальні дані щодо механізмів антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу створюють підґрунтя для їх обґрунтованого та раціонального застосування у складі нових антимікробних препаратів.

Окремі положення та результати дисертаційної роботи впроваджено в освітній і науковий процес кафедр фармакології провідних закладів вищої медичної та фармацевтичної освіти України, зокрема 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.) та Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (протокол № 4 від 10.11.2023 р.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність. Наукові положення, висновки і рекомендації, які викладено в дисертації є обґрунтованими, оскільки вони базуються на результатах власних мікробіологічних, фармакологічних, біохімічних, фізико-хімічних, мікроскопічних, молекулярних, статистичних дослідженнях.

Чіткий дизайн, обрані адекватні методи дослідження, проведений науковий пошук, достатній обсяг проведених досліджень і відповідна їх математико-статистична обробка підтверджують ступінь обґрунтованості та вірогідності результатів дисертаційної роботи. Висновки, практичні рекомендації роботи витікають з результатів проведених досліджень та підтверджують досягнення мети – експериментально обґрунтувати доцільність розробки нових засобів профілактики та лікування біоплівкових інфекцій на підставі дослідження фармакодинаміки похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу. Представлена дисертаційна робота виконана на сучасному науковому рівні та відповідає вимогам щодо проведення наукових досліджень.

Апробація результатів дисертації та публікації. Матеріали дисертації були представлені на 13 наукових конференціях: Буковинському міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених, ВІМСО – 2018 (Чернівці, 2018), 4th International conference of cell biology (Краків, 2018), Науковій конференції присвяченій 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології» (Київ, 2019), IV Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2020), Дистанційній науково-практичній конференції «Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині» (Харків, 2020), Науково-практичній конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова» (Харків, 2020), Віртуальному Міжнародному симпозиумі зі зменшення біологічної загрози 2021 р. (IBTRS 2021), III Scientific and practical Conference of young researchers “Youth and modern problems of

microbiology and virology“ (Київ, 2021), II науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології (Пам'яті професора В.В. Дунаєва)» (Запоріжжя, 2022), IV Scientific and practical Conference of young researchers “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology“ (Київ, 2022), III науково-практичній міжнародній дистанційній конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, 2023), Міжнародній науково-практичній конференції «Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України і світу» (Київ, 2023), Міжнародній науково-практичній конференції «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології НФаУ (Харків, 2024).

Результати досліджень опубліковано у 23 наукових публікаціях, 8 з яких - статті у фахових виданнях України, 5 – у журналах, включених до наукометричної бази Scopus, 2 – у періодичних наукових виданнях інших держав.

Зміст та структура дисертації, її завершеність, відповідність установленим вимогам щодо оформлення. Дисертаційна робота викладена на 250 сторінках комп'ютерного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, характеристики матеріалів та методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел літератури, у якому 351 джерело (18 кирилицею й 333 латиницею).

Робота ілюстрована 9 таблицями та 49 рисунками. Дисертацію написано за класичною схемою, літературною українською мовою. Всі розділи дисертації викладено чітко із дотриманням структури роботи відповідно до дизайну дослідження.

У «Вступі» використана загальноприйнята схема оформлення: стисло викладена актуальність теми дисертації, сформульовані мета і задачі дослідження, представлено загальну характеристику роботи.

Перший розділ дисертації виконано в достатньому обсязі (20 сторінок друкованого тексту, що складає близько 10% від загального обсягу роботи). В розділі проведений глибокий аналіз сучасної в переважній більшості зарубіжної наукової літератури щодо загальних відомостей про бактеріальні біоплівки та їх роль у розвитку хронічних інфекцій. Особливу увагу авторка приділила сучасним науковим даним про молекулярно-генетичні механізми плівкоутворення та сучасні підходи до антимікробної хіміотерапії біоплівкових інфекцій, в тому числі з використанням адамантанвмісних сполук.

У другому розділі описано дизайн дослідження, характеристику експериментальних тварин, їх розподіл, умови утримання та терміни і методи виведення із експерименту. Крім того, описано загально прийняті мікробіологічні, фармакологічні, біохімічні, фізико-хімічні, мікроскопічні та молекулярні методи дослідження у достатній мірі, не перенавантажуючи деталями. В розділі надана детальна характеристика речовин (сполук) та мікроорганізмів, які були використані в дослідженні, а також описані математико-статистичні методи дослідження. В цілому обрані методи дозволяють вирішити висунуті наукові завдання та досягнути поставленої мети наукової роботи.

Третій розділ містить результати дослідження впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на формування біоплівки в експериментах *in vitro*, а також на неспецифічні та специфічні фактори адгезії, утворення клітин-персистерів. Крім цього досліджено антиадгезивну активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу в експериментах *in vivo* та на засобах медичного призначення.

У ході дослідження встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 проявляють антибіоплівкову активність на ранніх етапах формування біоплівки грамположитивних і грамнегативних мікроорганізмів, знижуючи їх біомасу та життєздатність. Виявлено антиадгезивні й антимікробні властивості адамантанвмісних сполук в умовах *in vivo*, а також їх здатність впливати на персистентні форми окремих бактерій. Отримані дані підтверджують перспективність подальших досліджень цих сполук для створення ефективних антимікробних препаратів.

У четвертому розділі представлені результати власних досліджень чутливості сформованих біоплівок бактерій до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу та їх впливу на продукцію компонентів позаклітинного матриксу біоплівок. Авторкою встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу проявляють активність щодо біоплівок *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa*, у тому числі за дії субінгібуючих концентрацій, не поступаючись або перевищуючи препарати порівняння. Виявлено, що АМ-166 знижує біомасу та метаболічну активність клітин у біоплівках *P. aeruginosa*. Показано, що механізм дії щодо *S. aureus* пов'язаний із проникненням сполук у біоплівку, тоді як інгібування біоплівок грамнегативних бактерій зумовлене впливом на синтез білкових і полісахаридних компонентів матриксу; при цьому проникнення через матрикс біоплівок грамнегативних мікроорганізмів не виявлено.

П'ятий розділ присвячений дослідження впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на експресію генів у бактерій. За допомогою

сучасних молекулярно-генетичних методів встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу порушують адгезію та плівкоутворення у *S. aureus*, *E. coli* і *P. aeruginosa* шляхом зміни транскрипційної активності генів, пов'язаних з адгезинами, QS-регуляцією, синтезом матриксу, рухливістю та енергетичним метаболізмом; для *S. aureus* також доведено індукцію геномної мінливості, а для *P. aeruginosa* — дозозалежну модуляцію синтезу полісахаридів матриксу.

У шостому розділі наведені результати вивчення антивірулентних властивостей похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу. Зокрема, встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 проявляють антивірулентну активність щодо *P. aeruginosa*, змінюючи продукцію основних факторів вірулентності та регуляцію QS-систем і ефлюкських pomp, причому характер впливу залежить від штаму; виявлено перспективність цих сполук як основи для подальших *in vivo* фармакодинамічних і фармакокінетичних досліджень.

У розділі «Аналіз і узагальнення результатів дослідження» об'єднано та систематизовано отримані результати дисертаційного дослідження, проведено коректне порівняння їх з даними інших авторів, представлено власне бачення та розуміння науково-практичної задачі та можливих шляхів її розв'язання.

Дисертація завершується чітко сформульованими авторкою конкретними висновками, які базуються на результатах проведених досліджень. Висновки, які наведені в дисертації, зроблені на основі визначення їх статистичної вірогідності, повністю відповідають поставленим завданням дисертаційного дослідження, віддзеркалюють зміст роботи та свідчать про досягнення поставленої мети, викладені логічно і послідовно.

Список використаних джерел представлений у відповідності до вимог МОН України, містить першоджерела вітчизняних і зарубіжних авторів за включно до 2025 р., близько 45 % з яких складають публікації за останні 5 років. Зустрічаються джерела літератури, рік публікації яких більше 20 років, проте, їх використання виправдане посиланнями на першоджерела загальноприйнятих стандартних методик.

Дискусійні положення та зауваження до дисертації. Водночас із загальною позитивною оцінкою дисертаційної роботи були виявлені ряд орфографічних, пунктуаційних та стилістичних неточностей та виникло ряд зауважень щодо змісту та оформлення, які були виправлені у процесі рецензування і не мали принципового характеру, що могло би вплинути на загальну оцінку дисертаційної роботи та зменшити її науково-практичну

цінність. Проте, вважаю за необхідне висловити окремі зауваження та побажання:

1. В розділі «Матеріали та методи дослідження» методики описано дуже детально, рекомендую зробити їх опис більш лаконічним.

2. У розділах з результатами є фрагменти описового характеру з даних літератури, необхідно деякі з них скоротити та перенести інформацію у відповідні розділи дисертаційної роботи.

3. Бібліографія налічує 351 літературне джерело, деяким з яких є більше ніж 20 років, вважаю необхідним оновити їх або скоротити обсяг, якщо це не вплине на суть викладеної інформації.

4. У роботі не усі зазначені у тексті дисертації аббревіатури винесені у «Перелік умовних позначень, символів, одиниць вимірювання, скорочень».

Наведені зауваження не знижують наукової значущості роботи та не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи Гуменюк Н.І.

Під час ознайомлення з роботою до дисертантки виникли такі запитання, на які бажано отримати відповідь у процесі наукової дискусії:

1. У чому, на вашу думку, полягає механізм антибіоплівкової активності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій?

2. Яким чином можна пояснити стимулювання плівкоутворення саме грамнегативними бактеріями у присутності низьких концентрацій KBM-97?

2. Чому для дослідження впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на відносний рівень експресії генів, що регулюють функціонування ефлюксних pomp, ви обрали лише штами *P. aeruginosa*?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертаційна робота Гуменюк Наталії Ігорівни «Фармакодинамічні особливості антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу», яка подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія», є завершеною науковою працею, що містить нові обґрунтовані наукові положення та результати, які розв'язують важливі науково-прикладні завдання щодо експериментального обґрунтування доцільності розробки нових засобів профілактики та лікування біоплівкових інфекцій на підставі дослідження фармакодинаміки похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу. За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертації не було виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації. Представлена дисертаційна робота Гуменюк Наталії Ігорівни є актуальною і своєчасною, доповнює знання щодо можливості розробки нових засобів профілактики та лікування біоплівкових інфекцій на підставі дослідження фармакодинаміки похідних 4-(1'-

адамантил)-1R-бензолу, ефективність яких доведена експериментально. За методологічним рівнем виконання, змістом, науковою новизною, обґрунтованістю основних положень і висновків наукова робота відповідає «Вимогам до оформлення дисертації», затверджених наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 р. та постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», №44 від 12 січня 2022 р., а її автор Гуменюк Наталія Ігорівна заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

доцент закладу вищої освіти
кафедри мікробіології, вірусології та імунології
Полтавського державного
медичного університету МОЗ України,
кандидат медичних наук, доцент

Марія ФАУСТОВА