ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувачки кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України Волощук Наталії Іванівни на дисертацію **Дорошенко Анни Ігорівни** за темою **«Сорбційна та протимікробна ефективність композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом»**, поданої до спеціалізованої Вченої ради 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук зі спеціальності 14.03.05 – фармакологія

Актуальність обраної теми.

Антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань є однією з найбільших проблем сучасної медицини. Швидкість, з якою формується і розповсюджується стійкість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, вражає. Препарати, які ще декілька років тому були ефективними, сьогодні втрачають свої позиції і їх використання вимушено обмежується. Згідно даних ВООЗ, швидке підвищення стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів загрожує підірвати основи охорони здоров'я, зроблені медичною наукою протягом останніх 50 років. Проблема резистентності є багатогранною і важкою для вирішення. Проблема виникнення і швидкого розповсюдження резистентності збудників на даний час ще далека до свого остаточного вирішення.

Ще однією вкрай серйозною проблемою наразі є формування біоплівок - симбіозу мікроорганізмів, занурених в утворений ними позаклітинний білково-полісахаридний матрикс. Утворення біоплівок нерідко є наслідком лікарських маніпуляцій, процедур та оперативних втручань.

Основними напрямками вирішення проблеми антибіотикорезистентності та покращення протимікробної терапії є, з одного

боку, правильне та контрольоване застосування наявних лікарських засобів в медицині, в сільському господарстві та харчовій промисловості. А з іншого боку, одним з напрямків може бути пошук, вивчення та застосування нових засобів з антимікробною дією, серед яких є дезінфікуючі засоби. Вищезазначене свідчить, що напрямок наукової роботи А.І. Дорошенко є своєчасним і актуальним.

Ефективність протимікробних засобів, у тому числі катіонних дезінфектантів, може підвищуватися при їх сполученні з сорбентами, які також здатні затримувати на своїй поверхні та виводити мікроорганізми з уражених ділянок шкіри. Тому важливим є розробка композитів, що містять антимікробний компонент та сорбент, з метою покращення специфічної дії та підвищення безпечності засобу. Перспективним, з точки зору дисертанта, є композит, що складається з похідного гуанідину – полігексаметиленгуанидину гідрохлориду (ПГМГ-ГХ) та нанодисперсного кремнезему (НДК). Авторка мала на меті на підставі експериментальних досліджень встановити доцільність використання композиту НДК+ПГМГ-ГХ для лікування термічних та інфікованих ушкоджень шкіри.

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

Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України в рамках теми «Експериментальні дослідження нанодисперсного кремнезему з гуанідином» (№ державної реєстрації 0115U004157). Дисертант є співвиконавцем цієї тематики.

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

Для досягнення мети, яку окреслила дисертантка, було визначено 6 завдань, виконання яких в сукупності дає змогу досягти поставленої мети.

При проведенні досліджень застосовані сучасні об'єктивні методи: фармакологічні, біохімічні, гематологічні, імунобіохімічні, гістологічні,

психологічні, що відповідає меті та завданням дослідження. Результати досліджень опрацьовані сучасними статистичними методами.

Загальні висновки роботи цілком відповідають поставленим завданням, і повністю віддзеркалюють основні результати, що отримав автор. Всі теоретичні узагальнення та висновки дисертації базуються на результатах власних досліджень і повністю відображають закономірності, які були виявлені в ході проведення експериментів. Тому вважаю наукові положення та висновки дисертації обґрунтованими, узгодженими з метою та задачами дослідження.

Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів.

Дисертантом вперше проведене комплексне порівняльне дослідження композиту НДК+ПГМГ-ГХ на предмет наявності у нього сорбційних, протимікробних та регенеративних властивостей. Автором показано, що антибактеріальна дієвість цієї фармацевтичної композиції зумовлена гуанідиновим дезінфектантом ПГМГ-ГХ, який в повній мірі забезпечує лікування інфікованих ушкоджень шкіри, та адсорбентом у вигляді нанодисперсного кремнезему, який очищує та прискорює загоєння ушкоджень шкіри різного ґенезу. При цьому за токсичністю цей композит поступається чистому дезінфектанту.

Також пріоритетним є експериментально підтверджений пригнічувальний вплив композиту, що вивчався як на формування, так і на сформовану біоплівку мікроорганізмів.

В роботі показано, що виражена ранозагоювальна дія композиту за експериментального термічного опіку в щурів підтверджується клінічними спостереженнями за тваринами (швидкістю загоєння рани) та позитивними морфологічними змінами - відсутністю гнійно-некротичних ускладнень, прискоренням очищення і епітелізації термічних та інфікованих ушкоджень

шкіри. За цими властивостями НДК+ПГМГ-ГХ має переваги перед препаратом порівняння хлоргексидином.

Базуючись на результатах біохімічних досліджень механізмів дії комплексної сполуки, дисертантка доказово підтвердила, що композит НДК+ПГМГ-ГХ зменшує концентрацію прозапальних цитокінів, усуває дисбаланс у системі оксиду азоту та підсилює антиоксидантні процеси у вогнищі ураження.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані дисертантом результати значно поглиблюють існуючі уявлення про фармакологічні властивості композиту НДК+ПГМГ-ГХ як протимікробного та сорбційного засобу для лікування термічних та інфікованих ушкоджень шкіри, профілактики ускладнень та прискорення загоєння та обґрунтовують доцільність його подальших доклінічних і клінічних досліджень та впровадження в медичну практику в якості оригінального засобу з мультимодальною дією, що включає сорбційну, протимікробну, антибіоплівкову, протизапальну і ранозагоювальну активності що дозволить розширити асортимент вітчизняних лікарських засобів для лікування термічних та інфікованих уражень шкіри.

За матеріалами дисертаційної роботи видано інформаційний лист № 211 про нововведення у сферу охорони здоров'я «Іноваційні підходи до фармакологічної корекції опікових ран з використанням композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом».

Результати дисертації впроваджені в навчальний процес кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету, кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, кафедри фармакології Дніпропетровської медичної академії, кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету, кафедри фармакології, клінічної фармакології, патологічної фізіології Київського медичного університету та кафедри

фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

Апробація результатів дослідження. Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: науково-практичній конференції з міжнародною участю «Youth Nanobiotech-2015»; молодіжному форумі з нанобіотехнологій, 20–21 травня 2015 року, м. Київ, Україна; «Annual Young Medical Scientists' Conference 2017», 27–29 жовтня 2017 року, м. Київ, Україна; X Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів із клінічної фармакології: «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини», 7–8 листопада 2019 року, м. Вінниця, Україна; II Міжнародному конгресі «Раціональне застосування антибіотиків у сучасному світі. Antibiotic resistance STOP!», 15–16 листопада 2019 року, м. Київ, Україна; науковому симпозіумі з міжнародною участю «Сучасні теоретико-практичні аспекти реалізації впровадження «Стратегії розвитку народної і нетрадиційної медицини» у первинну ланку охорони здоров'я», 22 листопада 2019 року, м. Київ, Україна.

Основний зміст дисертації та його оцінка.

Дисертація Дорошенко А.І. викладена на 157 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, аналізу та узагальнення результатів, загальних висновків, списку використаних джерел та 6 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 103 сторінки друкованого тексту. Робота ілюстрована 40 таблицями, 27 рисунками. Список використаних джерел містить 132 найменування, з них 85 кирилицею та 47 латиницею.

Її структура та обсяг відповідають чинним вимогам щодо кандидатських дисертацій.

Вступ містить всі необхідні підрозділи, складає 7 сторінок, написаний лаконічно із включенням посилань на дослідження вітчизняних та іноземних авторів, що займаються близькою тематикою. В ньому автор відобразила актуальності теми дисертації, сформулювала мету і завдання дослідження.

Охарактеризовано наукову новизну дослідження та її практичне значення. Наведено дані щодо публікацій та апробації основних результатів досліджень.

В розділі 1, присвяченому аналітичному огляду літератури за темою ***«Сорбенти та катіонні дезінфектанти. Властивості, перспективи у створенні нових лікарських засобів антимікробної дії»*** на 26 сторінках дисертантом у повній мірі розкрито сучасний стан проблеми, визначені невирішені питання та теоретично обґрунтовано проведення даного дисертаційного дослідження. Дисертант наводить інформацію про опікову травму як актуальну проблему сучасної медицини (1.1.), визначає роль та місце медичних сорбентів у медичній практиці (1.2.), а також дає детальну характеристику фармакологічним властивостям та застосуванню дезінфікуючих та антисептичних засобів, зокрема, полігексаметиленгуанідину гідрохлориду в клінічній практиці та розкриває можливості нанодисперсного кремнезему як перспективній речовині для розробки сорбентів нового покоління (1.3 та 1.4). Розділ написаний лаконічно та грамотно, легко сприймається та свідчить про загальну ерудицію дисертанта.

Розділ 2 традиційно присвячений опису ***матеріалів та методів дослідження***. Він викладений на 18 сторінках і містить характеристику лабораторних тварин, експерименти на яких провів дисертант із дотриманням біостичних норм, що засвідчено висновком комісії з питань біомедичної етики. В експериментах автором використано ціла низка лікарських сполук: субстанція високодисперсного кремнезему марки А-300 (ТОВ «Орисіл-Калуш», Україна) та 20 % розчин ПГМГ-ГХ (ПФ «Терміт»), «Силікс», порошок для оральної суспензії (ЗАТ «Біофарма», Україна), «Ентеросгель», паста для перорального застосування (ПрАТ «ЕОФ «КРЕОМА-ФАРМ», Україна); ципрофлоксацин («Ципринол», 0,2 % розчин для інфузій), (KRKA, Словенія), гентаміцину сульфат, 4 % розчин для ін'єкцій (ПАТ «Галичфарм», Україна); хлоргексидин («Хлорексидин-КР», 0,05 % розчин для зовнішнього застосування), (ПАТ «Хімфармзавод "Червона зірка"», Україна). Дієвість досліджуваного композиту та референс-препаратів автор досліджувала на 6

еталонних тест-штамах умовно-патогенних мікроорганізмів: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Klebsiella pneumoniae, Candida albicans* та клінічниому штамі *P. aeruginosa* 449, виділеному від пацієнтів ДУ «Інститут урології НАМН України».

Дослідження *in vivo* проведені на 71 білій нелінійній миші віком 2–2,5 місяці та масою 18–22 г та 48 нелінійних білих щурах масою 200–250 г Основні моделі для оцінки лікувальних властивостей, які використала А.І. Дорошенко – це валідизовані моделі термічного опіку шкіри та гнійних абсцесів. Експериментальні клінічні дані підтверджувались біохімічними та морфологічними дослідженнями, а їх результати після адекватної статистичної обробки дали змогу зробити обґрунтовані висновки.

Всі експериментальні дослідження були виконані згідно дотримання необхідних етичних норм., що підтверджено висновком комісії з біоетики НМУ ім. О.О. Богомольця.

У **розділі 3** ***«Дослідження токсикологічних властивостей композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлориду»*** (18 стор., 2 підрозділи, 6 таблиць) було визначено гостру токсичність композиту та його компонентів при нашкірному та внутрішньошлунковому введенні. Гостра токсичність оцінювалась за показником виживаності тварин, динаміки маси тіла, особливостей поведінки та масових коефіцієнтів внутрішніх органів після одноразового введення композиту та його складових. Встановлено, що за умов нашкірного нанесення композит НДК+ПГМГ-ГХ можна віднести до VI класу токсичності (за Сидоровим К. К.) – відносно нешкідливі речовини, і подальше визначення LD_{50} за нашкірного нанесення не є доцільним.

Дослідження гострої токсичності композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом при внутрішньошлунковому введенні дозволяють віднести цей композит до малотоксичних сполук відповідно до класифікації речовин за токсичністю,

при чому токсичність окремої складової (ПГМГ-ГХ) у складі композиту була меншою, ніж за нарізного введення.

У **розділі 4** ***«Дослідження сорбційних та антимікробних властивостей композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом in vitro»*** (26 стор., 5 підрозділів, ілюстрований 12 таблицями та 15 рисунками). Автор показала, що композит НДК+ПГМГ-ГХ виявляє виражену адсорбційну активність щодо сполук з низькою (метиленовий синій), середньою (ціанокобаламін) та незначну щодо сполук із високою молекулярною масою (альбумін людський, желатин) за значень pH 6,0, що моделюють кислотно-основне середовище рани.

Вивчення антибактеріальних властивостей зразку композицій з урахуванням особливостей вивільнення активної субстанції (максимального часу збереження специфічної антимікробної дії) щодо клінічного штаму *P. aeruginosa* 449 показало, що композит НДК+ПГМГ-ГХ проявляє виразну дію, зумовлену бактерицидним ефектом препарату, який зберігався протягом доби. Експериментально встановлено, що композит впливає на ріст та розмноження клінічного штаму синьогнійної палички.

Дослідження біоплівко-утворюючих властивостей композиту НДК+ПГМГ-ГХ (попередження утворення біоплівок та її руйнування) показало, що композит НДК+ПГМГ-ГХ впливає як на процес плівкоутворення, так і руйнує вже сформовані біоплівки *P. aeruginosa*. До дії композиту НДК+ПГМГ-ГХ більш чутливі біоплівки, які знаходяться на стадії її формування, ніж сформовані біоплівки, що свідчить про профілактичну направленість дії та перспективність створення препаратів для попередження плівкоутворення.

В окремій серії дослідів дисертантка досліджувала зміни рухливості синьогнійної палички в різних середовищах під впливом різних доз досліджуваного композиту. Автор отримала дані про дозозалежний характер впливу композиту. А саме, НДК+ПГМГ-ГХ, більш виразно пригнічує рухливість синьогнійної палички, обумовлену пілями IV типу (твітчінг-

міграція), не впливає (у концентрації 40 мкг/мл), або стимулює (у концентрації 90 мкг/мл) рухливість бактерій за типом сворминг-міграції, та інгібує рух *P. aeruginosa* за типом свіммінг-міграції.

Наприкінці розділу автор дослідила вплив композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом на гідрофобність поверхні бактеріальних клітин та їх адгезивну активність (розділ 4.5.), яка є важливим фізичним чинником, що визначає інтенсивність формування біоплівок, оскільки гідрофобні бактерії адгезуються краще, ніж гідрофільні. Було показано, що досліджуваний композит НДК+ПГМГ-ГХ сприяв незначному збільшенню гідрофобності клітин бактерій залежно від концентрації на 0,9 % (у концентрації 40 мкг/мл) та 8,7 % (у концентрації 90 мкг/мл), у порівняння з інтактним контролем ($p < 0,05$).

Цей розділ, як і інші, закінчується переліком наукових праць, в яких висвітлені його результати.

Розділ 5 «***Дослідження антибактеріальних та ранозагоювальних властивостей композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом in vivo***» займає обсяг 30 сторінок, ілюстрований 10 рисунками та 21 таблицею. В ньому автор наводить комплексне дослідження впливу нашкірного нанесення композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлориду на загоєння термічного опіку та експериментального абсцесу шкіри у щурів.

Автором показано, що застосування композиту НДК+ПГМГ-ГХ вірогідно скорочувало термін загоєння ран (площа рани зменшувалася на 44,4 % (7 доба), 63,4 % (14 доба), 88 % (21 доба), 99,5 % (28 доба) при порівнянні з площею нанесеного опіку. Оцінка біохімічних змін в крові та вогнищі запалення показала, що досліджуваний тест-зразок чинить виражений протизапальний ефект, про що свідчить зниження рівня IL-1β і TNF-α та збільшення IL-10 у крові та шкірі протягом всього дослідження, володіє окрім антимікробних ще й протизапальними властивостями, про що свідчить зниження рівня загальних метаболітів азоту, нітрит-аніонів та нітратів як у

крові, так і шкірі та нормалізує оксидантно-антиоксидантний гомеостаз, що проявляється у нормалізації рівня ДК і ТБК-АП уже на 14 добу, відновленням активності Кат і СОД на 21 і 7 добу спостереження порівняно з хлоргексидином. Морфологічні зміни шкіри за опікового та гнійно-септичного ураження надали додаткові докази протимікробної та ранозагоювальної дії досліджуваного нанокомпозиту.

Описовий матеріал дисертаційної роботи став основою для його обговорення та пов'язування з існуючими даними літератури, логічно і послідовно представлений автором у розділі ***«Аналіз та узагальнення результатів досліджень»*** В ньому на 15 сторінках автором здійснено дає глибокий та всебічний аналіз отриманих результатів власних досліджень в контексті їх співставленні із існуючими даними літератури. Отримані результати переконливо доводять наявність багатовекторної дії нового вітчизняного композиту на основі антисептичного засобу – похідного гуанідину та нанодисперсного кремнезему за умов опікового та гнійно-септичного ураження шкіри та обґрунтовують доцільність розробки та його використання в клінічній практиці. У даному розділі проявилися ерудиція дисертанта, глибоке розуміння досліджуваної проблеми

Висновки з дисертації (8 висновків) А.І. Дорошенко витікають зі змісту роботи та відповідають меті та поставленим завдання дослідження, що вказує на завершеність роботи.

Список літератури містить 131 найменування, з них 84 кирилицею та 47 латиницею. Аналіз цитуємого контенту показав що наукові праці останніх 5 років становлять більше 75% всіх джерел.

6. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій і опублікованих працях та в авторефераті.

За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць: 7 статей, серед яких 6 – у наукових профільних виданнях, рекомендованих МОН України, 1 – у зарубіжному науковому виданні, 2 патенти України на корисну модель, 1 інформаційний лист, 5 тез доповідей.

Враховуючи все вищенаведене, можна зробити висновок, що робота А.І. Дороненко є самостійною завершеною науковою працею.

Ідентичність змісту автореферату та основних положень дисертації.

Автореферат оформлений у відповідності до існуючих вимог. Зміст автореферату повністю відповідає результатам, викладеним у дисертації, та її структурі.

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту і оформлення.

Ознайомлення з рукописом дисертації та авторефератом показало відповідний високий рівень виконання роботи, грамотне оформлення та викладення отриманих результатів.

Принципових зауважень в процесі ознайомлення з дисертацією не виникло, однак хочеться відмітити деякі недоліки, на які слід звернути увагу:

1. Перш за все, досить важким для сприйняття є абревіатура композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом (НДК+ПГМГ-ГХ). Часте повторювання цього скорочення на додачу до його складових протягом всього тексту утруднює читання та опанування матеріалу. Можливо, було би доцільним дати якусь робочу назву цьому засобу.

2. Розділи власних досліджень, особливо 4-й та 5-й, містять цілу низку підрозділів, в яких описані різні експерименти та їх результати. Було би доречно наприкінці розділів зробити узагальнюючі висновки.

3. Оскільки досліджували антимікробну активність порошкової композиції, то мабуть автору було б доцільніше використати метод лунок («колодязів»), а не «диско-дифузійний», так як останній прийнятний для вивчення антибіотикочутливості або рідких форм антимікробних засобів, якими можна імпрегнувати *ex tempore* стандартний стерильний паперовий диск.

Зазначені зауваження не є принциповими і суттєво не впливають на науково-практичну цінність роботи, яка в цілому заслуговує позитивної оцінки.

В плані дискусії хотілось би почути думку дисертанта з приводу наступних **питань:**

1. При застосуванні композиту НДК+ПГМГ-ГХ для лікування термічного опіку вами було досліджено зменшення площі рани на 7-14-21-28 доби. Уточніть будь ласка, за якими критеріями, окрім зменшення площі, Ви оцінювали позитивну динаміку ранозагоєння?

2. Чим ви поясните механізм позитивного впливу на репарацію обпечених тканин при застосуванні композиту, якщо відомо що антисептик ПГМГ є поверхнево-активною речовиною, і як більшість поверхнево-активних речовин пригнічує утворення грануляційної тканини при глибоких опіках?

3. На основі одержаних результатів дослідження впливу композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом на мікроорганізми *P. aeruginosa* як автор може охаратеризувати антимікробну ефективність щодо планктонної та біоплівкових форм мікроорганізму? В якому випадку мікроорганізми володіли вищою чуливістю до засобу?

4. Автором проведено морфологічне дослідження тканин шкіри, підшкірної клітковини, вилучених із зони термічного ураження стегна щурів, усіх дослідних груп у відповідні терміни експерименту. Уточніть які визначальні гістологічні ознаки свідчили про позитивну динаміку регенерації тканин в ділянці опіку, інфікованого синьогнійною паличкою?

Відповідність дисертації обраній спеціальності, профілю спеціалізованої вченої ради та вимогам МОН України

Дисертаційна робота **Дорошенко Анни Ігорівни** за темою **«Сорбційна та протимікробна ефективність композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом»**, подана на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія є закінченим науковим дослідженням, присвяченим вирішенню актуального наукового завдання, спрямованого на підвищення ефективності фармакотерапії термічних та інфікованих уражень шкіри

шляхом використання нового композиту НДК+ПГМГ-ГХ, які одночасно виявляють сорбційний, протимікробний, антибіоплівковий, протизапальний та ранозагоювальний ефекти. За методичним рівнем виконання, за актуальністю, об'ємом, адекватними методами дослідження, науковою новизною одержаних результатів, теоретичним і практичним значенням, достатністю й повнотою опублікування матеріалу, апробацією на наукових форумах різного рівня відповідає встановленим вимогам п.10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р., та № 657 від 27.07.2016 р.), що висуваються до дисертаційних робіт, поданих на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент -
завідувач кафедри фармакології
Вінницького національного
медичного університету імені М. І. Пирогова
МОЗ України,
доктор медичних наук, професор Н.І. Волощук

17.03.2021

Міністерство охорони здоров'я України
Вінницький національний медичний університет
код 02010896

Підпис Волощук Н.І.
засвідчую.
Начальник відділу кадрів
Вінницького національного
медичного університету
імені М. І. Пирогова
14.03 2021