

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Онищук Людмили Валеріївни «Експериментальне обґрунтування створення лікарського препарату для інтравагінального застосування з протизапальною та протимікробною активністю», поданої до офіційного захисту в спеціалізовану вчену раду при Національному фармацевтичному університеті МОЗ України на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність теми. Однією із вкрай важливих та актуальних проблем ХХІ століття є резистентність мікроорганізмів до дії антимікробних препаратів (АМП). Стійкість збудників інфекційних захворювань до дії АМП нівелює заходи щодо профілактики інфекційних хвороб, знижує ефективність протимікробної терапії, збільшує тривалість перебування пацієнтів у стаціонарі та матеріальні витрати на їх лікування. Нині антибіотикорезистентність розцінюється у багатьох країнах світу не тільки як загроза їх національній безпеці, а й як загроза існуванню земної цивілізації як такої.

Антибіотикорезистентні штами мікроорганізмів обумовлюють захворювання жіночих статевих органів, суттєво погіршують якість життя, знижують можливість розвитку вагітності внаслідок трубно-перитонеального ураження інфекцією, негативно впливають на перебіг вагітності, післяпологовий період тощо. На сьогодні характерною особливістю запальних захворювань органів малого тазу є перевага хронічних процесів над гострими та їх рецидивуючий перебіг, що зумовлено формуванням мікробних асоціацій – біоплівок.

Зниження ефективності антимікробної хіміотерапії потребує розробки та впровадження у клінічну практику препаратів, дія яких направлена на декілька мішеней, оскільки такий вплив зменшить вірогідність швидких мутацій у клітинах мікроорганізмів. Увагу фармакологів привертають комбіновані препарати, оскільки, завдяки комбінації декількох антимікробних препаратів розширюється спектр дії, досягається синергічний ефект і підвищується ефективність терапії, знижується ризик появи стійких штамів мікроорганізмів та мінімізується токсичність для організму пацієнта. Важливим наслідком комбінації антимікробних препаратів є комплексний вплив на механізми реалізації резистентності. Перевага комбінованих антимікробних препаратів у можливості розробки препаратів з фіксованою дозою для забезпечення дозового режиму та досягнення терапевтичного ефекту.

На увагу заслуговують неантимікробні препарати, які у комбінації з АМП підвищують ефективність терапії, впливаючи на різні ланки патологічного процесу, серед яких – нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ). У представників НПЗЗ (диклофенак, ібuproфен, ацетилсаліцилова кислота тощо) виявлена антимікробна активність щодо планктонних та біоплікових мікроорганізмів, яка

реалізується впливом на системи *Quorum sensing*, зв'язуванням з QS-асоційованими білками.

Таким чином, все вищевикладене свідчить про актуальність наукової роботи Онищук Л.В., присвяченої розробці та вивченю ефективності нового комбінованого лікарського засобу з протимікробною та протизапальною дією, здатного впливати на різні ланки патологічного процесу.

Зв'язок теми дисертації з науковими державними та галузевими програмами і планами. Дисертація є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Експериментальне обґрунтування створення нового лікарського засобу з протимікробною та протизапальною активністю» (№ державної реєстрації 0115U000907). Автор дисертаційної роботи є відповідальним виконавцем зазначеної теми.

Загальні відомості про роботу.

Дисертацію викладено на 236 сторінках комп'ютерного тексту, з яких 160 сторінок основного тексту. Робота містить анотацію, список публікацій за темою дисертації, зміст, перелік умовних позначень, вступ, огляд літератури (розділ 1), опис матеріалів і методів дослідження (розділ 2), 4 розділи власних досліджень (розділи 3-6), аналіз та узагальнення результатів, висновки та додатки; ілюстрована 31 таблицею та 40 рисунками. Структура та обсяг рукопису відповідають вимогам до кандидатських дисертацій.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 19 наукових робіт: 8 статей, серед яких 5 – у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 3 – у зарубіжних наукових виданнях, 1 з них у виданні Scopus; 9 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій з міжнародною участю. Отримано 2 патенти України на корисну модель.

Основний зміст дисертації та його оцінка.

В анонтації дисертації наведено узагальнений короткий виклад її основного змісту. Основна частина дисертації містить вступ, огляд літератури, розділи дисертації та висновки.

У **вступі** дисерант обґрунтоває вибір теми дослідження, актуальність проведеного дослідження, чітко формулює мету і завдання роботи, визначає предмет і об'єкт дослідження, зазначає методи дослідження, характеризує наукову новизну та практичну значущість отриманих результатів та зазначає особистий внесок у виконання дисертаційної роботи. Наведено дані щодо публікацій основних результатів наукової роботи, структури дисертації та обсягу дослідження.

В огляді літератури (розділ 1) у чотирьох підрозділах висвітлено питання щодо впливу інфекційно-запальних захворювань на репродуктивну функцію

жінки, ролі умовно-патогенних мікроорганізмів, факторів імунної системи та інших чинників у розвитку запального процесу жіночих статевих органів. Також у цьому розділі наведено дані щодо фармакотерапії інфекційно-запальних захворювань піхви, проблеми та шляхи її вирішення.

У розділі 2 («*Матеріали та методи дослідження*») дисертаційної роботи описано використані матеріали та методи дослідження, дана характеристика експериментальних тварин, а також їх розподіл на групи. В дослідженнях *in vitro* використано зразки песаріїв, що містять субстанції клотримазолу, метронідазолу, ібупрофену та їх комбінації, *in vivo* – зразок-лідер MKI-4. Експерименти *in vivo* проведено на щурах лінії Вістар (201 тварина), кролях (30 тварин) та 195 нелінійних мишах. Авторка наводить перелік тест-штамів мікроорганізмів та поживних середовищ, використаних для культивування бактерій та грибів, зазначає дотримання біоетичних норм з посиланням на висновок комісії з біоетики. У даному розділі відображені загальновизнані експериментальні методи, які відповідають меті та завданням наукового дослідження. Методична база охоплює сучасні мікробіологічні, фармакологічні, біохімічні, гістологічні, імунологічні, токсикологічні та статистичні методи дослідження. У розділі наведено дизайн експериментів.

Скринінг специфічної antimікробної дії активних інгредієнтів песаріїв з різним кількісним та якісним складом проведено на еталонних тест-штамах бактерій та грибів методом серійних розведень у рідких живильних середовищах з визначенням мінімальної інгібувальної концентрації (МІК). Antimікробна дія песаріїв досліджена також на щільних поживних середовищах з визначенням діаметра зон затримки росту мікроорганізмів. Мікробіологічні методи застосовані і при визначенні антибіоплівкової дії клотримазолу, метронідазолу, ібупрофену та тест-зразка MKI-4. Методика вивчення антибіоплівкової активності детально описана. Протизапальна дія ібупрофену вивчена на щурах на моделі шкірних ран, MKI-4 – на моделі карагенінового набряку стопи щурів. Ефективність песаріїв оцінювали на моделі експериментальних вагінітів (травматичному, асептичному та змішаної етіології). Травматичний вагініт отримували механічним подразненням слізової оболонки піхви, асептичний вагініт – хімічним подразненням (10 % розчин азотнокислого срібла, експозиція 5 хв), вагініт змішаної етіології – зрошенням вагіни розчином аміоксу та пероральним введенням антибіотика, з наступним нанесенням мікст-культури (*C.albicans+S.aureus*). У роботі використані морфологічні та імунологічні методи (фагоцитарна активність лейкоцитів, функціональна та цитотоксична активність лімфоцитів та макрофагів, рівень ЦК) дослідження. Гостру токсичність тест-зразка MKI-4 вивчали на мишах-самицях лінії Balb/c (внутрішньошлункове та інtravagінальне введення) та на нелінійних щурах-самицях (іntravagінальне введення). Токсичність MKI-4 у підгострому експерименті вивчали на нелінійних

шурах-самицях при введенні у межах доз 9,42 – 942 мг/кг, щоденно впродовж 3 місяців. Місцевоподразнююча дія оцінена за умови одноразового нанесення, повторних нашкірних аплікацій та інтравагінального введення.

Експерименти проведені відповідно до чинних вітчизняних та зарубіжних методичних рекомендацій, методики відповідають сучасному рівню, достатньо інформативні, ґрунтуються на принципах наукової доказовості і достовірності. Підтвердженням, зокрема, є відбір тест-штамів для досліджень, які здійснені з урахуванням пріоритетності щодо розробки лікарських засобів (критичний рівень пріоритетності – *E. coli*, високий – *S. aureus*). Це свідчить про глибокі фахові знання дисертуванки.

У розділі 3 («Скринінг антимікробної та протизапальної активності зразків комбінованого лікарського засобу у формі песаріїв») наведено результати скринінгу антимікробної дії експериментальних зразків песаріїв з різним якісним та кількісним складом щодо еталонних тест-штамів мікроорганізмів: *S.aureus* ATCC 6538, *C.albicans* ATCC 10231 та *C. sporogenes* ATCC 19404. На першому етапі дисертуванки визначала специфічну антимікробну активність однокомпонентних, двокомпонентних зразків песаріїв, що містили метронідазол (до 500 мг), клотrimазол (до 500 мг) або обидва компоненти. Згідно з отриманими даними, активні інградієнти песаріїв не спровалюють негативного впливу на специфічну антибактеріальну та антифунгальну активність один одного. У подальших дослідженнях методом дифузії у щільні поживні середовища обґрунтовано оптимальний кількісний склад песаріїв: клотrimазол – 400 мг, метронідазол – 100 мг (зразок-лідер МК-4). Збільшення концентрації діючих речовин не супроводжується зростанням антимікробної активності.

У другому підрозділі цього розділу представлені результати скринінгу протизапальної активності ібупрофену, отримані в експериментах на шурах на моделі шкірних асептичних ран. Згідно з отриманими результатами, оптимальна концентрація ібупрофену – 80 мг. У подальшому Онищук Л.В визначала вплив ібупрофену на специфічну антибактеріальну та антифунгальну активність діючих речовин песаріїв – клотrimазолу та метронідазолу, та обґрунтувала оптимальний склад зразка-лідера МКІ-4 (клотrimазол – 400 мг, метронідазол – 100 мг, ібупрофен – 80 мг). Включення до складу песаріїв ібупрофену свідчить про обізнаність Онищук Л.В. з сучасними підходами щодо розробки лікарських засобів антимікробної дії, які включають створення комбінованих препаратів, складовими яких є інградієнти з добре вивченим фармакологічним та токсикологічним профілем. Логічними є вибір тест-культур для скринінгу, зазначені мікроорганізми є представниками аеробних та анаеробних мікроорганізмів, що обумовлюють запальні захворювання органів малого таза.

Розділ 4 («Дослідження гострої, хронічної токсичності та місцевоподразнююальної дії комбінації лідера МКІ-4») викладено у 4 підрозділах.

У підрозділі 4.1 наведено результати вивчення гострої токсичності за умови введення MKI-4: внутрішньошлунково, в межах доз 942-9420 мг/кг, та інтратагінально – введення у дозі 942 мг/кг. Загибель тварин не зареєстрована, негативного впливу на організм тварин не виявлено. У другому підрозділі наведено дані щодо впливу MKI-4 на організм тварин за умови тривалого введення (протягом 30 днів) у дозах 9,42 мг/кг, 94,2 мг/кг, 942 мг/кг. Дисерантка не виявила статистично достовірних змін маси тіла, показників периферичної крові, біохімічних показників тощо. Відсутність негативного впливу підтверджена гістологічними дослідженнями внутрішніх органів. У третьому підрозділі наведено результати дослідження місцевоподразнюючої дії комбінації-лідера MKI-4 за умови нашкірного нанесення та інтратагінального введення.

Розділ 5 («Вивчення специфічної активності комбінації-лідера MKI-4») присвячений вивченю ефективності MKI-4 на моделі травматичного, асептичного вагініту та вагініту змішаної етіології.

Ефективність MKI-4 при травматичному вагініті підтверджена морфологічними (зменшення проявів запальної реакції, покращення стану слизової оболонки піхви – товщина епітелію збільшилась на 97,8 %), імунологічними (зниження продукції активних форм кисню, нормалізація клітинної ланки імунітету) дослідженнями, нормалізацією співвідношення жирних кислот, зменшенням рівня арахідонової жирної кислоти у тканинах піхви у 3,2 рази (за дії препарату «Нео-Пенотран®» – зниження у 2 рази). В обговоренні результатів до цього розділу дисерантка надає пояснення щодо зменшення вмісту у тканинах арахідонової кислоти, зазначає, що зазначений ефект забезпечує складовий інгредієнт MKI-4 – ібупрофен. Отримані дані свідчать, що MKI-4 за ефективністю на моделі травматичного вагініту не поступався препарату «Нео-Пенотран®».

Отримані дані щодо ефективності MKI-4 на моделі асептичного вагініту свідчать, що застосування досліджуваного комбінованого тест-зразка сприяло збільшенню товщини епітелію до 174,8 мкм на відміну від препарату порівняння «Нео-Пенотран®», який не справляв позитивного впливу на слизову оболонку піхви. Слід відмітити, що позитивний ефект виявляє також основа песаріїв (збільшення товщини епітелію до 149,9 мкм). Дисерантка кваліфіковано, детально описує морфологічні препарати та аналізує отримані результати за відновленням стану слизової оболонки (товщиною, набряком, наявністю крововиливів, відторгненням пошкодженої тканини), впливом на показники клітинного імунітету (фагоцитарна активність, фагоцитарний індекс), зниженням тригеру запального процесу – арахідонової кислоти, робить висновок про ефективність MKI-4 та його переваги перед Нео-Пенотраном. Не виключено, що такий ефект виявляє саме ібупрофен, оскільки останнім часом накопичено достатньо даних щодо імуномодулювального ефекту НПЗЗ (вплив на експресію

IFN- γ , ІЛ-17, ІЛ-13, ІЛ-4 тощо). Отримані результати свідчать про перспективність застосування MKI-4 у постменопаузальному періоді у пацієнток з атрофічним вагінітом.

Ефективність MKI-4 тест-зразка підтверджена і на моделі змішаного вагініту у мишей, ускладненому мікст-інфекцією (*S.aureus+C.albicans*). У цьому розділі Онищук Л.В. приділяє значну увагу імунологічним дослідженням, що зрозуміло, оскільки при запальних процесах мікробної етіології, зокрема при стафілококовій інфекції, порушується функціональна активність лейкоцитів, знижується рівень Т- та В-лімфоцитів тощо. Недостатність функціонування природніх факторів резистентності організму сприяє проникності патогену у слизові оболонки та розвитку запального процесу. Терапія комбінацією MKI-4 призводить до відновлення імунологічної реактивності організму.

Розділ 6 («Дослідження антибіоплівкової активності комбінованих песаріїв MKI-4»). Одним із найбільш розповсюджених порушень екосистеми піхви у жінок є бактеріальний вагіноз, що у 90 % випадків асоціюється з біоплівковими мікроорганізмами. З біоплівками пов'язують високі показники рецидивів захворювання (блізько 30 % протягом 3 місяців після лікування). У зв'язку з цим, результати дослідження, наведені у цьому розділі є важливими. Етапи дослідження характеризуються логічною структурою, включають: визначення чутливості планктонних мікроорганізмів до компонентів песаріїв, встановлення адгезивності тест-культур до абіотичної поверхні, плівкоутворення за дії окремих компонентів песаріїв щодо монокультур, підбір мікст-культури для визначення плівкоутворення, дослідження формування біоплівки мікст-культурою за сумісного впливу активних інгредієнтів песаріїв, антибіоплівкова активність MKI-4 та вітепсолу щодо монокультур бактерій та грибів, а також мікробних асоціацій.

Дисертантка у розділі 6 наводить переконливі дані, що активні інгредієнти препарату MKI-4 виявляють інгібуючий вплив не тільки щодо планктонних мікроорганізмів, але й до біоплівок, сформованих монокультурами та бактеріально-грибковими асоціаціями. Метронідазол та клотримазол у межах концентрацій 100-400 мкг/мл виразно порушують плівкоутворення *C.albicans* та *S.aureus* (інгібуvalна дія клотримазолу щодо *C.albicans* блізько 94 %, щодо *S.aureus* – 100 %; метронідазолу щодо *S.aureus* – 75 %, *C.albicans* – 57 %). Виразний інгібуvalний ефект виявляє і ібупрофен (до 76,7 %, залежно від концентрації та мікроорганізму). Вираженість інгібуvalного ефекту вітепсолу залежить від тест-культури. Антибіоплівкова дія MKI-4 щодо мікст-культури є дозозалежною. Слід відмітити, що Онищук Л.В. при плануванні досліджень врахувала сучасні дані щодо основної форми існування мікроорганізмів – біоплівок. Дисертантом детально продуманий вибір мікст-культури, оскільки стафілокок та гриби роду *Candida* використовують продукти свого метаболізму

та підвищують стійкість до АМП. Важливим є дослідження антибіоплівкової дії з використанням саме клінічних штамів мікроорганізмів: *S.aureus* 222 є метицилінрезистентним, *C.albicans* – стійким до дії флуконазолу.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» Онищук Л.В. узагальнює отримані результати, обґрутує підбір компонентів тест-зразків песаріїв та ефективність зразка-лідера на різних моделях в експериментах *in vivo*.

Робота завершується 7 висновками, які пов’язані з результатами дослідження, відповідають задачам дослідження та відображають фактичні дані.

Список джерел літератури наведено на 30 сторінках у порядку цитування, налічує 292 найменувань, з яких 59 – кирилицею, 233 – латиницею. 168 (57,9 %) цитованих джерел – за останні 10 років, 79 (27,1 %) – датовані 5 роками.

У додатках містяться патенти, акти впровадження, список публікацій та дані щодо апробації результатів наукової роботи.

Наукова новизна наукових результатів.

Ступінь новизни високий, дисертаційна робота пов’язана з мікробною резистентністю, підвищенням ефективності антимікробних засобів і виконана з урахуванням рекомендацій ВОЗ та згідно з Національним планом дій боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів (2019 р.). Вперше експериментально, з урахуванням закономірностей перебігу патологічного процесу, що включає ерадикацію патогенної мікробіоти, зменшення проявів запального процесу, нормалізацію функції імунної системи, обґрутовано доцільність розробки нового лікарського засобу для фармакологічної корекції захворювань жіночих статевих органів. Встановлено відсутність антагоністичного ефекту між компонентами розробленого засобу щодо протимікробної та протизапальної дії та безпека за умови тривалого застосування. Доведена ефективність на моделі травматичного, асептичного вагініту, вагініту змішаної етіології та доцільність застосування у клінічній практиці при хронічних, рецидивуючих запальних захворюваннях. Вперше встановлено, що терапія комбінацією MKI-4 призводить до відновлення імунологічної реактивності організму.

Наукову новизну підтверджено патентами України на корисні моделі №144453 (2020 р.) та №144452 (2020 р.).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено новий комбінований засіб у лікарській формі «песарії» з антимікробними та протизапальними властивостями, які реалізуються складовими інгредієнтами – метронідазолом, клотримазолом та ібупрофеном. Розроблений лікарський засіб може бути використаний для профілактики запальних захворювань жіночих статевих органів, підвищення ефективності терапії при гострих запальних процесах та для раціональної фармакотерапії хронічних біоплівкових патологій. Отримані результати є підґрунтям для поглиблених доклінічних досліджень та

розробки дизайну клінічних випробувань зразка-лідера MKI-4 як засобу профілактики та терапії захворювань жіночих статевих органів.

Запропоновано спосіб оцінки змін ліпідного метаболізму при лікуванні експериментального вагініту у щурів (патент України на корисну модель №144453, 2020 р.) та спосіб оцінки змін ліпідного обміну при лікуванні травматичного вагініту у щурів (патент України на корисну модель №144452, 2020 р.). Результати роботи впроваджено у науково-дослідну роботу ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України» (протокол № 14 від 23.01.2020 р.); Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 8 від 01.06.2020 р.), Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 4 від 04.03.2020 р.), кафедри фармацевтичної технології і біофармації НМАПО імені П.Л. Шупика, кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (протокол № 87 від 17.01.2020 р.).

Зауваження, що стосуються оформлення та змісту дисертації та автореферату

Суттєвих недоліків у дисертації та авторефераті не виявлено, дисертація і автореферат написано логічно, з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення, хоча є деякі зауваження та побажання.

- У тексті дисертації виявлені орфографічні та стилістичні помилки, а також невдалі вирази. У авторефераті у підписі до рис. 7 відсутній критерій оцінки антибіоплівкової активності (% утвореної біоплівки).

- На мою думку, доцільно у підписах до рисунків та у назвах таблиць для кращого сприйняття матеріалу препарат порівняння зазначати не як «ПП», а повною назвою «Нео-Пенотран®».

- Некоректно зазначати при вивчені гострої токсичності зразка MKI-4 рівні доз, залежні від ЛД₅₀: 1/10 ЛД₅₀, ½ ЛД₅₀ та 1 ЛД₅₀, оскільки летальність тварин відсутня. Доцільніше було зазначити відібрану дозу 9420 мг/кг, як максимальну, при якій летальність тварин не зареєстровано. Доцільніше було охарактеризувати профіль безпеки, а не клас токсичності саме для препарату MKI-4, оскільки рекомендовано оцінювати токсичність речовин.

Наведені зауваження не є принциповими і не зменшують наукової значимості роботи. При рецензуванні дисертаційної роботи виникли запитання:

1. Основа песаріїв MKI-4, як і препарату порівняння «Нео-Пенотран®» – вітепсол. Що Вам відомо про осмотичні властивості вітепсолу та зразка-лідера MKI-4? Яким вимогам щодо ексудативної активності повинна відповісти основа песаріїв?

2. Чому для підтвердження ефективності зразка-лідера на моделі змішаного вагініту не використовували специфічні методи оцінки, зокрема мікробну контамінацію у динаміці протягом визначеного терміну терапії?

3. Чим пояснюється здатність активних інгредієнтів досліджуваного зразка MKI-4 впливати на вміст ліпідів у сироватці крові?

4. Чим обґрунтовано вибір дози для досліджень ефективності *in vivo* зразка-лідера MKI-4 53 мг/кг? Які розрахунки Ви здійснювали для отримання цієї дози?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Онищук Людмили Валеріївни «Експериментальне обґрунтування створення лікарського препарату для інтравагінального застосування з протизапальню та протимікробною активністю» на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.05.03 – фармакологія – є завершеним науковим дослідженням. Робота присвячена вирішенню наукової проблеми – підвищення ефективності терапії пацієнток із захворюваннями жіночих статевих органів шляхом розробки нового лікарського засобу. За актуальністю, методичним рівнем виконання, науковою новизною та практичним значенням, достатністю та повнотою опублікованого матеріалу дисертаційна робота відповідає встановленим вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами), а її автор Онищук Людмила Валеріївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Завідувач лабораторії фармакології
протимікробних засобів
ДУ «Інститут фармакології та
токсикології НАМН України»,
доктор медичних наук

Н.О. Вринчану

Підпис Вринчану Н.О. засвідчує:
заст. директора з наукової роботи
ДУ «Інститут фармакології та токсикології
НАМН України»
д.х.н., Григор'єва Г.С.

