

ВІДГУК

професора кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України, доктора медичних наук, професора Бірюкової Світлани Василівни на дисертаційну роботу Кондратюка Вячеслава Миколайовича «Мікробіологічне обґрунтування нової концепції протимікробної терапії інфекційно-запальних ускладнень бойових поранень у збройному конфлікті сучасності», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Актуальність теми

Дисертаційна робота Кондратюка В. М. на тему «Мікробіологічне обґрунтування нової концепції протимікробної терапії інфекційно-запальних ускладнень бойових поранень у збройному конфлікті сучасності» присвячена вирішенню важливої проблеми підвищення ефективності профілактики та лікування гнійно-запальних ускладнень вогнепальних та мінно-вибухових бойових ран на основі мікробіологічного та епідеміологічного моніторингу в сучасних умовах АТО в Україні. Ця проблема залишається важливою та однією з найскладніших в хірургії.

Особливістю збройного конфлікту на Україні стало використання ракетно-артилерійських систем, у зв'язку з чим у структурі поранень найбільшу частку складають поранення кінцівок з пошкодженням м'яких тканин, що приводило при недостатньої допомоги к розвитку хірургічної інфекції на різних етапах лікування, це в свою чергу зумовлює збільшення терміну стаціонарного перебування, кількості оперативних втручань.

Під впливом лікування та переміщення пораненого вдовж евакуаційного ланцюга відбувається зміна домінуючого етіологічного чинника та його відношення до антибактеріальних препаратів, які застосовуються в схемі лікування на фоні виснаження адаптаційних механізмів імунної системи.

Слід зазначити, що інфекційні ускладнення найчастіше обумовлені бактеріями з множинною стійкістю до антибіотиків та підвищеною здатністю формувати біоплівки.

Механічне очищення ран з використанням ультразвукової кавітації, висічення ран, застосування вакуумної обробки значною мірою руйнують біоплівкові утворення. Впродовж подальших 24 годин створюються найбільш оптимальні умови введення антибактеріальних препаратів, тому розробки локального введення препаратів є актуальною метою в лікуванні ранового процесу. Найбільш оптимальним є лікування з використанням комбінації антибіотиків, але не завжди дає позитивний результат, крім того потребує часто збільшення дози, а це в свою чергу впливає на адаптаційні системи імунітету. В останні роки все частіше використовують комбінацію антибіотика та антисептика, враховуючи здатність антисептиків впливати на бактерії незалежно від їх метаболічної активності. Ця проблема може бути успішно вирішеною вибором матриці, з якої буде вивільнятися препарат. Всі ці положення явились основою розробки нової концепції в боротьбі з гнійно-запальними ускладненнями мінно-вибухових бойових ран.

Дисертаційна робота Кондратюка В. М. виконана в рамках планової НДР «Вивчення біологічних властивостей мікроорганізмів, віднесених Всесвітньою організацією охорони здоров'я до списку «пріоритетних патогенів», що несуть загрозу здоров'ю людини та розробка засобів боротьби з ними» (№ держреєстрації 011721006903), тобто цілком відповідає пріоритетному напрямку науки і техніки та сучасним положенням щодо вивчення бойових поранень.

Завершеність дисертаційного дослідження

Для досягнення поставленої мети, а саме створення сучасної концепції застосування протимікробних засобів у лікуванні вогнепальних та мінно-вибухових бойових ран, були визначені завдання, які включали вивчення етіологічної структури інфекційних ускладнень у поранених на різних етапах лікування та біологічних властивостей бактерій, що контамінують рани. До

складу завдань також входило вивчення фенотипових прояв та генетичних маркерів, які відповідають за відношення до антибіотиків та інше.

На наш погляд важливим завданням є розробка рецептури полімерної депо-форми антисептиків для локального використання. Наступне завдання дало можливість обґрунтувати доцільність полімерних систем комплексного застосування антисептиків та антибіотиків для лікування інфекційних ускладнень бойових поранень та розробити рекомендації щодо профілактики та лікування їх.

Аналіз результатів дисертаційної роботи Кондратюка В. М. дає змогу визначити, що всі завдання поставлені автором були виконані на достатньому обсязі експериментів з використанням сучасних і адекватних методів дослідження – мікробіологічних, молекулярно-генетичних, епідеміологічних, математико-статистичних.

У роботі наведені нові дані щодо етіологічної структури, динаміки видового та кількісного складу мікроорганізмів, що викликають інфекційні ускладнення вогнепальних та мінно-вибухових ран. Встановлено, що у сучасному збройному конфлікті нового типу в Україні, причиною інфекційних ускладнень стають бактерії, що мають внутрішньо госпітальне походження, а не мікроорганізми, які потрапляють до рани при первинному забрудненні. За результатами бактеріологічних досліджень ран на всіх існуючих рівнях хірургічної допомоги пораненим під час антитерористичної операції, доповнено наукові дані про зміни домінуючої мікрофлори поранень у різні часові інтервали. Вперше узагальнено результати моніторингу антибіотикорезистентності збудників інфекційних ускладнень бойових поранень, одержаних у військовому конфлікті на сході України. Вперше методом повного геномного секвенування проведено вивчення структури нуклеотидних послідовностей у мікрофлори, виділеної з бойових ран, визначено найбільш поширені генетичні маркери стійкості до антибіотиків. Гени, що відповідають за розвиток антибіотикорезистентності штамів, які відповідні за розвиток хірургічних ускладнень у поранених в АТО України,

внесені до бази GenBank® Національного центру біотехнології та інформації. Це дасть змогу подальшому вивченню розповсюдженості антибіотикорезистентних штамів з певним набором генів у різних країнах Світу. Отримані нові наукові дані щодо біологічних властивостей чинників інфекційних ускладнень. Зокрема, поширеності здатності до біоплівкоутворення, її активації внаслідок впливу фізичних факторів, поєднання цього феномену з множинною стійкістю до антибіотиків, впливу на перебіг ранового процесу. Результатами проведених досліджень доповнено наукові дані щодо відмінностей у біологічних властивостях планктонних та плівкових форм бактерій, їх чутливості до антибіотиків і антисептиків, особливостей плівкоутворення під впливом сучасних методів хірургічного лікування. В експерименті *in-vitro* вперше встановлено, як під впливом негативного тиску (-125 атм), а вакуумтерапія є розповсюдженою практикою у лікуванні бойових поранень, мікроорганізми родів *Acinetobacter*, *Pseudomonas* та родини *Enterobacteriaceae* змінюють свій фенотип, активуючи біоплівкоутворення. Штами, які в нормальних умовах визначались як не здатні до біоплівкоутворення, переходили до категорії біоплівкоутворюючих ($p < 0,05$). За результатами поглибленого вивчення етіологічної структури збудників і прогнозованих змін у співвідношенні домінуючих видів в процесі ранозагоєння, та на основі нових даних про їх біологічні властивості вперше визначені рекомендації, щодо профілактики та лікування інфекційних ускладнень бойових поранень в сучасному військовому конфлікті, а також обґрунтовані заходи, що попередять розвиток та поширення множинної стійкості до антибіотиків серед мікроорганізмів.

Вперше експериментально обґрунтовано підходи щодо подолання стійкості збудників інфекційних ускладнень до антибіотиків в процесі лікування нагноєнь у поранених шляхом поєданого застосування системної антибіотикотерапії та нових полімерних систем локальної доставки антисептиків з числа четвертинних амонієвих сполук. Розроблено рецептуру нової полімерної композиції з пролонгованими протимікробними

властивостями, виготовлено серію експериментальних зразків, всебічно досліджено особливості кінетики вивільнення з них антисептиків, визначено вплив на процес загоєння ран, доведено ефективність лікування ран, інфікованих полірезистентними до антибіотиків мікроорганізмами.

З урахуванням фенотипових проявів та наявних генів антибактеріальної резистентності у найбільш поширених чинників ускладнень визначені препарати та їх комбінації для ефективної антибактеріальної профілактики, а також стартової емпіричної терапії у випадку розвитку інфекційних ускладнень. Визначено перелік антибіотиків, що потребують адміністративного обмеження до застосування.

Вперше вивчено епідеміологічні особливості поширення штамів мікроорганізмів, що спричиняють хірургічні інфекції поранень, в умовах сучасного військового конфлікту. Методами співставлення фенотипів антибактеріальної стійкості та мультілокусного секвенування клінічних ізолятів, що виділені у географічно віддалених госпіталях, встановлено ступені спорідненості цих мікроорганізмів. Доведено, що рани сучасних бойових поранень контамінуються спорідненими клональними популяціями, які мають спільне джерело походження, і слід визнати, що вони є госпітальними. Виявлення серед ранових ізолятів кількох клональних популяцій, які мають спільне джерело походження, дає підстави розробляти заходи антибактеріальної терапії та профілактики в масштабах всього лікувально-евакуаційного ланцюга, а не зосереджувати увагу лише на локальних особливостях резистентності в межах окремих військових шпиталів.

На основі порівняльного аналізу результатів визначення абсолютної та відносної кількості основних популяцій імунокомпетентних клітин периферичної крові у практично здорових людей та у постраждалих з бойовою травмою в динаміці вперше встановлено, що нейтрофільно-лімфоцитарне співвідношення має прогностичне значення щодо тривалості ранозагоювального процесу.

Наукова новизна підтверджена 4 патентами на винахід «Спосіб динамічної кількісної оцінки перебігу ранового процесу поранень кінцівок», «Спосіб лікування інфікованих та гнійних ран з використанням ВАК-терапії та методу проточно-промивної іригації», «Диско-дифузійний спосіб визначення механізму резистентності до бета-лактамних антибіотиків у стафілококів», «Полімерна протимікробна композиція для локальної доставки протимікробних речовин».

Дисертаційна робота Кондратюка В. М. охопила всі існуючі рівні хірургічної допомоги пораненим під час антитерористичної операції. Дослідження проводили на передових етапах надання хірургічної допомоги у військовому шпиталі м. Дніпра та 5 військово-медичних клінічних центрів - м. Київ, м. Харків, м. Вінниця, м. Львів, м. Одеса.

Дисертаційна робота написана за загальноприйнятим для таких робіт планом, викладена на 443 сторінках комп'ютерного тексту, складається з вступу, огляду літератури, семи розділів власних досліджень, аналізу одержаних результатів та їх обговорення, висновків і практичних пропозицій, додатків. Робота ілюстрована 96 рисунками та 70 таблицями. Список використаних джерел, який містить 381 посилань, серед яких кирилицею 112 та латиницею 269.

Розділ 1. Огляд літератури з питань сучасних проблем профілактики та лікування септичних ранових ускладнень. В цілому в огляді достатньо повно висвітлюються питання мікробіологічної характеристики інфекційних ускладнень бойових поранень і методів системної профілактики та лікування з використанням антибіотиків, антисептиків, розробки нових методів доставки їх в ранове ложе. Але бажано було б більше уваги приділити огляду даних літератури щодо спектру мікроорганізмів - контамінантів рани до хірургічної обробки. Відомо, що найбільшу частину їх складають спорові анаеробні мікроорганізми, насамперед *S.perfringens*. У роботі є тільки одне посилання на його знахідку при бойових діях у В'єтнамі, але все ж таки ці мікроорганізми є убіквітарними і поширені у інших країнах.

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень. У цьому розділі автор надає відомості про контингент поранених та методам, які були використанні при виконанні завдань роботи. Методи адекватні та досить інформативні. Значну кількість посилань присвячено препарату декаметоксин, який вже досить давно широко використовується як профілактичний та лікувальний препарат. На нашу думку ці матеріали можна скоротити та надати тільки його емпіричну формулу. Такі методи, як визначення антибіотикочутливості «методом колодязів», теж відомі.

Розділ 3. Характеристика спектру мікроорганізмів, що колонізують вогнепальні та мінно-вибухові рани. Автор ретельно вивчив якісну та кількісну характеристику мікробної контамінації поранень, біологічні властивості мікробів-контаміантів, їх чутливість до антибіотиків та антисептиків, здатність до біоплівкоутворення та характеристику генетичних детермінант цих властивостей. Слід насамперед зазначити, що не зовсім коректно говорити про спектр мікроорганізмів, які колонізують вогнепальні та мінно-вибухові рани, тому що автор вивчає не первинну контамінацію, а вже після радикальної хірургічної обробки рани, тобто мікробну характеристику ускладнень. Цікаві дані щодо ідентичності мікробної контамінації в різних шпиталях, що свідчить про розвиток шпитальних інфекцій. Автор показав, що в сучасному бойовому конфлікті на сході України у перші дні після поранення у спектрі мікроорганізмів переважають грампозитивні коки, які надалі заміщуються грамнегативними бактеріями. Ці дані підтверджують положення про те, що грампозитивні коки, а саме стафілокок, викликають гнильні процеси тканин і це дає змогу розмножуватися грамнегативним бактеріям. Бактерії-контаміанти характеризуються полірезистентністю до антибіотиків, що детермінується широким спектром генів, та більшість з них володіє здатністю до плівкоутворення. Автором було виявлено, що здібність до плівкоутворення та резистентність до антибіотиків не пов'язані між собою біологічні властивості мікроорганізмів, але забезпечують колонізаційну здатність бактерій.

Розділ 4. Епідеміологічні особливості поширення мікроорганізмів, чинників інфекційних ускладнень бойових поранень, у сучасній системі лікування. Результати фенотипового та генотипового аналізу штамів бактерій, виділених від поранених, що проходили лікування у географічно віддалених лікувальних закладах, свідчать про те, що бойові рани, одержані під час військових подій на сході України 2014-2017 рр., контамінувались спорідненими клональними популяціями бактерій, які мали спільне джерело походження і циркулювали в середовищі на шляхах лікувально-евакуаційного ланцюга. Зауваження до викладання цього розділу: деякі матеріали слід перенести до огляду літератури.

Розділ 5. Визначення прогностичного критерію розвитку інфекційних ускладнень бойових ран. Метою досліджень, викладених в матеріалах цього розділу було вивчення окремих показників імунного статусу поранених та визначення тих, на основі яких з високою вірогідністю можливо виділяти поранених з розвитком ускладнень, або ризиком затримки закриття ран. Автором проаналізовані показники клінічного обстеження крові поранених, а саме – інтегральні гематологічні індекси, адаптаційний індекс. Загоєння ран в термін до 21 доби відбувається на фоні підвищеної абсолютної кількості ІКК. Кількість лейкоцитів залишається підвищеною у 1,6 раза, нейтрофільних лейкоцитів у 1,53 раза, в тому числі сегментоядерних нейтрофільних лейкоцитів - у 1,29 раза, лімфоцитів у 1,66 раза, моноцитів - у 1,77 раза. Встановлено зростання відносної кількості лімфоцитів та моноцитів, що свідчить про формування специфічного імунітету. У постраждалих, рани яких не були закриті і на четвертому тижні, показники абсолютної кількості ІКК продовжували знижуватись переважно за рахунок нейтрофільних гранулоцитів та лімфоцитів. У цієї групи постраждалих тривають процеси запалення. Імунна відповідь макроорганізму реалізується переважно за рахунок системи неспецифічного захисту з залученням НГ. Оскільки у біоплівковій формі існування мікроорганізмів у ранах компрометується презентація бактеріальних антигенів, то не відбувається нормальної специфічної відповіді та збільшення

кількості лімфоцитів. Серед показників периферійної крові саме нейтрофільно-лімфоцитарне співвідношення має прогностичне значення щодо тривалості ранозагоювального процесу. За даними ROC - аналізу встановлено порогове значення на рівні 2,49. При такому рівні НЛС та вище необхідно передбачати тривалість ранозагоєння понад 21 добу. Зауваження. На мою думку назва цього розділу не відображає увесь комплекс проведених досліджень, вони значно ширше.

Розділ 6. Результати експериментальних досліджень впливу неферментуючої грамнегативної мікрофлори на процес загоєння ран.

Дослідження виконано на моделі сплінт-ран, яка дала змогу оцінити вплив властивостей мікроорганізмів до біоплівкоутворення на перебіг ранового процесу в умовах макроорганізму. Контамінація рани мікроорганізмами, що знаходяться у планктонній формі, породжує запальну відповідь, яка має високу інтенсивність та тривалість у часі. Надмірна активація імунокомпетентних клітин на початку розвитку запальної реакції відтерміновує розвиток репаративних процесів. Перебудова фенотипу бактерій з планктонної форми у біоплівкову в процесі колонізації ранової поверхні зменшує антигенну стимуляцію прозапальних клітин та явищ запалення в рановому ложі. Це сприяє вчасному припиненню фази запалення та переходу до фази регенерації.

Розділ 7. Результати експериментальних досліджень особливостей впливу засобів лікування на плівкові форми бактерій, що колонізують бойові рани.

У цьому розділі надані результати впливу різних режимів антибіотикотерапії та інших лікувальних заходів на бактеріальні біоплівки. Застосування ВАК-терапії сприяє посиленню процесу біоплівкоутворення мікроорганізмами, що може негативно впливати на ефективність заходів протимікробної терапії у комплексному лікуванні ран. У фазі регенерації у рані системна антибіотикотерапія потребує перегляду у напрямку деескалації з урахуванням її низької ефективності у відношенні плівкових форм існування мікроорганізмів у рані та протизапального впливу-складових біоплівкового матриксу. Антисептик з числа четвертинних амонієвих сполук декаметоксин і

антибіотики бета-лактамного, аміноглікозидного, фторхінолонового рядів в процесі сполученого впливу на мікробні клітини взаємно посилюють бактерицидну дію, що обґрунтовує доцільність їх комбінованого застосування у схемах комплексного лікування ранової інфекції. У присутності декаметоксину антибіотики у клінічно досяжних концентраціях можуть чинити ефективний протимікробний вплив навіть на антибіотикорезистентні варіанти бактерій, що колонізують поверхні у формі біоплівки.

Розділ 8. Результати розробки системи локальної доставки антисептика на основі полімерних композицій для лікування ранової інфекції. Результатами експериментального дослідження встановлено, що тривале підтримання суббактерицидних концентрацій декаметоксину локально в рані за допомогою депо-форм у поєднанні з системною антибактеріальною терапією є ефективною стратегією у лікуванні ранових інфекційних ускладнень спричинених резистентними збудниками. З метою уникнення гальмування репаративних процесів в рані при виборі форми антисептика для застосування необхідно враховувати фазу ранового процесу. Результати стереометричних спостережень загоєння експериментальних ран показали, що оптимальним періодом для використання запропонованої полімерної депо-форми декаметоксину є перші три-п'ять діб (фаза запалення) розвитку ранового процесу.

Розділ 9. Узагальнення та аналіз результатів. Автор досить чітко узагальнює результати проведених досліджень, які присвячені розробці нової концепції ефективної профілактики та лікування бойових поранень на основі вивчення біологічних властивостей мікробів-контамінантів і нових методів подолання антибіотикорезистентності та біоплівкоутворення. На основі проведених досліджень розроблені організаційно-методичні вказівки, в яких викладено основні положення профілактики та лікування бойових поранень. Розроблена стратегія локального застосування в рані полімерної композиції декаметоксину та антибіотиків, що дозволило уникнути гальмування репаративних процесів. Запропоновано використовувати для оцінки

адаптаційних механізмів макроорганізму порогове значення нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення, як показника тривалості ранозагоєння.

Зауваження, пропозиції та запитання до змісту дисертаційної роботи

Під час рецензування матеріалів дисертаційної роботи автору були зроблені певні зауваження щодо оформлення фактичного матеріалу (таблиці та інше), які представлені вище по розділах.

Загальне зауваження - перевантаження дисертаційної роботи рисунками та додатками.

Ці зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Запитання до дискусії:

1. Механізм розвитку антибіотикорезистентності складний процес, який може бути пов'язаний з наявністю R-плазмід, генами мікробної хромосоми, особливостями клітинної структури. Як Ви вважаєте, чи виявлені вами гени резистентності можуть мати також значення в розвитку нових механізмів проникнення антибіотика до бактеріальної клітини?

2. Чим можна пояснити, що на третьому тижні розвитку інфекції виділяється найбільша кількість антибіотикорезистентних штамів – 96,9 %?

3. Для лікувальної комбінації використовується амікацин, цефалоспорины 2 та 3-го покоління та карбапенеми, чим обумовлений цей вибір?

4. Чим Ви керувалися при виборі в якості антисептика декаметоксина? Цей антисептик відноситься до четвертинних амонієвих сполук, використання яких в останні роки вважається недоцільним. У чому його перевага над іншими антисептиками?

5. На вашу думку, який механізм сполученої дії антибіотиків та антисептиків?

6. Що було підставою рекомендації проводити бактеріологічне обстеження тільки ран з ознаками хірургічної інфекції, тобто вже ускладнень та не проводити бактеріологічних досліджень до хірургічного втручання?

Відповідність напрямку досліджень і змісту дисертації галузі науки, формулі спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради

За напрямком досліджень і змісту дисертаційна робота Кондратюка Вячеслава Миколайовича «Мікробіологічне обґрунтування нової концепції протимікробної терапії інфекційно-запальних ускладнень бойових поранень у збройному конфлікті сучасності», відповідає галузі науки – охорона здоров'я, паспорту (формулі) спеціальності медицина, 03.00.07 – мікробіологія та профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України».

Повнота висвітлення результатів дисертаційного дослідження в опублікованих працях (наукових фахових виданнях) та авторефераті.

Результати досліджень, основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації докторської дисертації Кондратюка В. М. оприлюднено і обговорено на 16 наукових форумах (міжнародних наукових конференціях з міжнародною участю), опубліковано 45 наукових праць (9 одноосібно), у тому числі 27 статей у наукових фахових виданнях (4 - включено до міжнародної наукометричної бази SCOPUS); три деклараційних патенти України на корисну модель, один деклараційний патент України на винахід, 13 тез у збірках матеріалів з'їздів та науково-практичних конференцій з міжнародною участю, 1 організаційно-методична вказівка.

Вказане вище, дозволяє визначити, що опубліковані праці в достатній мірі розкривають основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації дисертаційної роботи.

Висновок.

Докторська дисертація Кондратюка В.М. є завершеною науковою працею, виконаною на сучасному науково-методичному рівні. Робота вирішує надзвичайно актуальну проблему охорони здоров'я – профілактики та лікування гнійно-запальних ускладнень вогнепальних та мінно-вибухових бойових ран. На основі біологічних, епідеміологічних та молекулярно-генетичних досліджень створена нова концепція використання комбінованої системної та

локальної протимікробної терапії інфікованих ран. Розроблена нова депо-форма антисептика декаметоксину на основі полімерної композиції з чітко визначеною його дозою та оптимального часу використання. Для ефективної реалізації заходів профілактики та раціональної антимікробної терапії інфекційних ускладнень бойових поранень необхідно враховувати, що інфікування бойових ран відбувається переважно госпітальною флорою під час етапного лікування та евакуації поранених. Первинне призначення антибіотика повинне враховувати прогнозовану динаміку змін домінуючої мікрофлори у рановому ложі, а зміна антибактеріальної терапії проводиться на основі результатів динамічного моніторингу антибіотикорезистентності мікрофлори, відповідно до чітко визначеного переліку препаратів стартової антибіотикотерапії та антибіотиків резерву.

Дисертаційна робота Кондратюка Вячеслава Миколайовича за обсягом проведених досліджень, інформативністю використаних методів, актуальністю та методичним рівнем, науковою новизною, теоретичною та практичною значимістю цілком відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженому постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 із змінами та наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. №40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія.

Професор кафедри клінічної імунології

та мікробіології ХМАПО

доктор медичних наук, професор



Брюкова С. В.