

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри мікробіології, вірусології та імунології Івано-Франківського національного медичного університету
Куцика Романа Володимировича
на дисертаційну роботу Невмержицького Віталія Васильовича
"Протимікробні властивості нових мазевих композицій на основі екстракту хмелю вуглекислотного",
яка подається у спеціалізовану вчену раду Д 64.618.01 ДУ "ІМІ НАМН"
на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук
за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

Актуальність обраної теми.

Дисертаційна робота Невмержицького Віталія Васильовича, яка має назву "Протимікробні властивості нових мазевих композицій на основі екстракту хмелю вуглекислотного" спрямована на вирішення важливого наукового завдання в сучасній медичній галузі, а саме – розробці нових більш ефективних та безпечних протимікробних препаратів для лікування інфікованих ран.

На сьогодні лікування запальних процесів, які спричинюються умовно-патогенними мікроорганізмами, за допомогою хіміотерапевтичних препаратів (антибіотиків) не завжди дає бажаний ефект через відоме явище резистентності мікроорганізмів до протимікробних препаратів, розвиток можливих побічних реакцій. Особливо актуальним є питання альтернативної протимікробної терапії, коли йдеться про рановий процес у пацієнтів хірургічного профілю, адже його ускладнення часто призводять до загрозливого для життя стану.

Речовини рослинного походження, а саме хмель звичайний (*Humulus Lupulus* L.) представляє широкий спектр біологічної активності, у тому числі володіє бактерицидним та фунгіцидним ефектом. Можливість використання хмелю для розробки препаратів, що мають місцеве застосування, зокрема у вигляді мазей, є досить перспективним. Дослідження мазевих композицій на основі хмелю звичайного з визначенням найбільш оптимального складу стало метою даної дисертаційної роботи, у відповідності з якою були поставлені наукові і практичні завдання.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.

Дисертаційна робота Віталія Васильовича Невмержицького виконана у рамках планових прикладних науково-дослідних робіт в Державній установі "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України": "Експериментальне обґрунтування розробки лікарських засобів протимікробної дії з продуктами хмелю для профілактики і лікування

запальних захворювань ротової порожнини" (номер держреєстрації 0114U000247); "Розробка протимікробного засобу з екстрактом хмелю для лікування *acne vulgaris*" (номер держреєстрації 0117U002280); "Розробка протимікробного засобу на основі хмелепродуктів для місцевого лікування інфікованих ран та опіків" (номер держреєстрації 0120U100720), в яких здобувачем проведено патентний пошук, виконано експериментальні дослідження з вивчення спектру і рівня протимікробної активності екстракту хмелю вуглекислотного (ЕХВ) щодо референтних штамів бактерій та грибів, швидкості формування резистентності мікроорганізмів до ЕХВ, його цитотоксичну дію на клітини організму людини, також визначено органолептичні, фізичні і фізико-хімічні властивості зразків мазевих композицій та чутливість до них референтних та клінічних штамів збудників ранової інфекції.

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Сформульовані дисертантом основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації обґрунтовані достатньою кількістю експериментальних даних та їх статистичною обробкою. Використані методи наукових досліджень, а саме: мікробіологічні, цитологічні, технологічні та математико-статистичні є сучасними і відповідають вирішенню поставленої мети та завдань.

Дослідження проводились в лабораторії протимікробних засобів ДУ «ІМІ НАМН», яка атестована на проведення вимірювань у сфері поширення державного метрологічного нагляду згідно з галуззю атестації, що зазначено у додатку до свідоцтва.

Референтні штами мікроорганізмів - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653 були отримані в лабораторії медичної мікробіології з музеєм мікроорганізмів ДУ "ІМІ НАМН.

Клінічні штами представлені із колекції лабораторії протимікробних засобів (КЛПЗ) ДУ "ІМІ НАМН" (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*) і колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова МОЗ України (*Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Для вирощування мікроорганізмів цих різних таксономічних груп застосовувались типові рідкі та щільні поживні середовища, відповідно до виду мікроорганізмів та згідно з існуючими методичними рекомендаціями.

Отримані результати є зіставні з даними літератури, ілюстровані таблицями та рисунками, що дозволило автору сформулювати аргументовані

висновки й рекомендації.

Достовірність і новизна положень, висновків та рекомендацій сформульованих у дисертації.

Достатній обсяг виконаних тематичних експериментів, застосування адекватних методів досліджень (мікробіологічних, цитологічних, технологічних), достатня кількість взятих в експерименти культур мікроорганізмів, повноцінна статистична обробка отриманих результатів та їх об'єктивний аналіз обґрунтовує достовірність основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих в дисертаційній роботі.

В матеріалах дисертації чітко наведено кількість і походження використаних штамів мікроорганізмів, інгредієнтів та компонентів експериментальних зразків мазевих композицій, що досліджувались.

У відповідності з метою роботи для підвищення ефективності лікування ранової інфекції розроблено вісім зразків нових мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами.

Мікробіологічно обґрунтовано найбільшу ефективність антибактерійної та протигрибкової дії композиції № 8, яка містить компоненти у такому співвідношенні (мас. %): ЕХВ - 5,0; пропіленгліколь – 10,0; емульгатор 1 – 5,0; ПЕО 1500 – 28,0; ПЕО 400 – 52,0. Запропонована композиція у порівнянні із комерційним препаратом "Мазь календули" (ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», Україна) відносно тридцяти клінічних штамів домінуючих різновидів збудників ранової інфекції характеризується більш високим рівнем протимікробної активності.

Також вперше доведено, що у клінічних штамів *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *C. albicans* до дії ЕХВ резистентність формується повільно, а цитотоксичність ЕХВ на лінійних культурах людини характеризується прийнятними рівнями.

Повнота викладу сформульованих у дисертації наукових положень, висновків і рекомендацій в опублікованих працях та авторефераті.

Результати досліджень кандидатської дисертації Віталія Васильовича Невмержицького опубліковано в 25 наукових роботах, серед них 4 монографії (3 - закордонні), 6 статей у наукових фахових виданнях (2 – у закордонних виданнях), 1 патент України на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 1 інформаційний лист МОЗ України, 1 нововведення, 11 тез доповідей на наукових міжнародних конгресах, з'їздах, конференціях.

Автореферат структурно складається із загальної характеристики роботи, розділів, які віддзеркалюють її основний зміст, висновків, списку опублікованих робіт, анотацій українською, російською та англійською мовами. Матеріали автореферату досить повно розкривають зміст кожного розділу дисертації і формують повне уявлення про роботу в цілому. Опубліковані роботи та автореферат досить повно розкривають основні положення, висновки і

рекомендації дисертаційної роботи.

Структура, зміст і завершеність дисертаційної роботи.

Дисертація Віталія Васильовича Невмержицького складається із вступу, огляду літератури, основної частини, яка включає опис матеріалів і методів дослідження, п'ятьох розділів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій і списку використаних джерел, що містить 163 найменувань, з них 33 кирилицею та 130 латиницею. Робота викладена на 143 сторінках друкованого тексту (14 шрифт, 1,5 інтервал), ілюстрована дев'ятьма таблицями та шістьма рисунками.

Здобувач обґрунтував актуальність роботи і сформулював її мету, спрямовану на підвищення ефективності лікування інфікованих ран шляхом експериментального доказу перспективності застосування мазевої композиції на основі екстракту хмелю.

Для вирішення мети роботи автором підпорядковано п'ять завдань, які передбачали: (i) вивчення протимікробної активності екстракту хмелю вуглекислотного (ЕХВ) за показниками мінімальної інгібуючої, бактерицидної та фунгіцидної концентрації; (ii) визначення швидкості формування резистентності у збудників ранової інфекції до дії ЕХВ; (iii) дослідження цитотоксичної дії різних концентрацій ЕХВ на перещеплювані культури клітин людини; (iiii) розробку серії нових мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами; (iiiii) визначення чутливості референтних та клінічних штамів збудників ранової інфекції до дії експериментальних зразків мазевих композицій з ЕХВ та обрання найбільш перспективної.

У **вступі** дисертантом обґрунтовано актуальність вирішення для медичної галузі задачі розробки нового більш ефективного та безпечного протимікробного препарату для лікування інфікованих ран, висвітлено зв'язок роботи з науковими програмами і планами, сформульовано мету, визначено завдання дослідження для її досягнення, окреслено об'єкт та предмет дослідження, розкрито наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, наведено дані щодо апробації роботи, а також відомості про обсяг та структуру дисертації.

В **огляді літератури**, який складається із трьох підрозділів, описано сучасні уявлення про етіологічну структуру мікробних чинників ускладненого ранового процесу, особливості застосування м'яких лікарських засобів із протимікробною дією в комплексному лікуванні інфікованих ран та перспективи використання лікарських засобів на основі хмелепродуктів.

Розділ 2 "Матеріали і методи досліджень" складається із восьми підрозділів, в яких наведено дані про кількість і походження штамів мікроорганізмів та культур клітин, представлено відомості щодо поживних середовищ, лабораторного обладнання, активних протимікробних субстанцій та допоміжних речовин, які були використані дисертантом для проведення

досліджень. Повнота викладення автором мікробіологічних, цитологічних, технологічних та математико-статистичних методів є цілком достатньою для позитивної оцінки вибраних методів досліджень, їх сучасності з точки зору забезпечення якості проведення експериментів.

У розділі 3 "Характеристика протимікробної активності ЕХВ за показниками мінімальної інгібуючої, бактерицидної та фунгіцидної концентрації" автором визначено протимікробну активність ЕХВ за показниками МІК, МБК та МФК на тест-штамах грампозитивних (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus*) та грамнегативних (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерій та грибів *Candida albicans*.

За результатами цього розділу досліджень встановлено, що МІК ЕХВ для грампозитивних бактерій знаходиться в межах від 1,69 до 2,05 мг/мл, для грамнегативних – від 2,15 до 3,40 мг/мл, тоді як щодо *C. albicans* - 4,15 мг/мл. Подібна закономірність дії ЕХВ встановлена і за показником МБК, яка для бактерій коливається від 3,38 до 7,14 мг/мл, а фунгіцидний ефект досягався при збільшенні його концентрації майже у 2 рази відносно МІК і становив для *C. albicans* 8,53 мг/мл.

Аналіз отриманих даних, проведений дисертантом, засвідчує, що МІК ЕХВ для грампозитивних бактерій знаходиться в межах від 1,69 до 2,05 мг/мл (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. cereus*), для грамнегативних – від 2,15-2,26 (*E. coli*, *K. pneumoniae*) до 3,40 мг/мл (*P. aeruginosa*), тоді як МІК ЕХВ щодо *C. albicans* сягала 4,15 мг/мл. Подібна закономірність дії ЕХВ встановлена і за показником МБК, яка для бактерій коливається від 3,38 до 7,14 мг/мл, а фунгіцидний ефект (МФК) ЕХВ досягався при збільшенні його концентрації майже у 2 рази відносно МІК і становив для *C. albicans* 8,53 мг/мл.

У розділі 4 "Швидкість формування резистентності у збудників ранової інфекції до дії ЕХВ" за допомогою методу послідовних пасажів на живильних середовищах із зростаючими концентраціями ЕХВ дисертантом вивчено швидкість формування резистентності у збудників ранової інфекції до дії ЕХВ. За результатами експерименту доведено повільне формування резистентності до дії ЕХВ у клінічних штамів *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *C. albicans*.

Встановлено, що стійкість до дії ЕХВ у зазначених мікроорганізмів збільшувалась на тридцятому пасажі у 6-8, 12-15 та 12-14 разів, що підтверджується зростанням МІК у: *S. aureus* – 11,83 мкг/мл, *P. aeruginosa* – 45,30 мкг/мл та *C. albicans* – 53,95 мг/мл відповідно.

У 5 розділі "Цитотоксичність ЕХВ" Віталій Васильович Невмержицький визначив рівень безпечності ЕХВ як основної діючої речовини для клітин людського організму. Для цього використовувались дві лінії перещеплюваних еукаріотичних клітин людини - аденокарциноми гортані (Нер-2) та диплоїдних

фібробластів (М-19). Було визначено показники мінімальної токсичної концентрації (МТК - у мг/мл) та цитотоксичної концентрації, яка викликає загибель 50 % клітин у культурах (ЦК₅₀ - у мг/мл)

Цитотоксичну дію різних концентрацій ЕХВ (від 160,0 до 0,75 мг/мл) досліджено мікроскопічно на культурах перещеплюваних ліній епітеліальних клітин аденокарциноми гортані людини (Нер-2) і диплоїдних фібробластів людини (М-19) Виявлено, що збільшення концентрації ЕХВ індукувало розширення спектру ознак цитотоксичності. Також проведено кількісне визначення його *цитотоксичної концентрації*, яка викликає загибель 50 % клітин цих культур (ЦК₅₀), де відсоток загинувших клітин обох ліній корелює із концентрацією ЕХВ за прямою лінійною регресією. Для культури клітин лінії Нер-2 ЦК₅₀ ЕХВ становить 28,7 мг/мл, а для клітин лінії М-19 сягає 77,3 мг/мл

Отримані результати протимікробної активності (МІК) та цитотоксичної концентрації (ЦК₅₀) ЕХВ дозволили розрахувати його індекс селективності (ІС) для різних видів мікроорганізмів та ліній еукаріотичних клітин, визначений як відношення ЦК₅₀ до МІК, рівень якого є достатньо прийнятним для використання ЕХВ в якості основної діючої речовини.

У розділі 6 "Склад нових мазевих композицій з ЕХВ" викладено результати стосовно якісного та кількісного складу зразків нових мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами. Концентрація ЕХВ у зразках варіювала від 1,0 до 5,0 мас. %. Також до складу було включено пропіленгліколь, полісорбат 80, емульгатор № 1, ПЕО 1500 та ПЕО 400. За органолептичними характеристиками всі мазеві композиції цілком відповідають вимогам ДФУ 2.0 до м'яких лікарських форм і правилам виготовлення та контролю якості нестерильних лікарських засобів, які регулюються наказами МОЗ України.

У 7 розділі "Чутливість референтних та клінічних штамів збудників ранової інфекції до дії експериментальних зразків мазевих композицій з ЕХВ" автором визначено чутливість референтних та клінічних штамів збудників ранової інфекції до дії зразків нових мазевих композицій з ЕХВ та залежність їх протимікробної активності від якісного та кількісного складу.

Найвищі рівні протимікробної активності стосовно референтних штамів мікроорганізмів встановлено у композицій №№ 7 і 8. За результатами статистичної обробки даних (співставлення суми рангів по U-критерію Манна-Уїтні) діаметрів зон затримки росту референтних штамів мікроорганізмів під дією порівняних композицій №№ 7 і 8 найбільш перспективним визначено зразок маzewої композиції з ЕХВ № 8.

Автором визначено антибактерійну та протигрибкову дію оптимального складу маzewої композиції з ЕХВ № 8 щодо одинадцяти клінічних ізолятів найбільш значущих видів збудників ранової інфекції у порівнянні із "Календули

мазь " виробництва ТОВ "ДКП «Фармацевтична фабрика". Встановлено, що новий зразок маzewої композиції з ЕХВ характеризується високою протимікробною активністю щодо клінічних штамів *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* із зонами затримки росту в діапазоні $(25,8 \pm 1,3)$ мм – $(35,3 \pm 0,6)$ мм, що значно перевищувало показники препарату порівняння.

У "**Висновках**" (їх 5) Віталій Васильович Невмержицький підводить підсумки результатів експериментальних досліджень та їх теоретичних узагальнень щодо мікробіологічного обґрунтування розробки маzewої композиції на основі екстракту хмелю вуглекислотного для підвищення ефективності лікування інфікованих ран. Доведено медичну перспективність експериментального зразку маzewої композиції з ЕХВ, яка характеризується достатньо вираженою антибактерійною та фунгіцидною активністю, повільним формуванням резистентності у патогенів, а також відсутністю цитотоксичної дії на еукаріотичні культури клітин людини.

Практичні рекомендації. щодо використання результатів дисертаційної роботи Мельника А. Л. мають медико-прикладне (доцільність подальшого застосування результатів експериментів в розробці нового протимікробного засобу у формі мазі на основі ЕХВ для підвищення ефективності лікування ранової інфекції) і навчально-педагогічне (використання матеріалів дисертаційної роботи у навчальному процесі кафедр мікробіології, вірусології та епідеміології вищих медичних навчальних закладів).

Список використаних джерел викладено з дотриманням чинних бібліографічних вимог ДСТУ 8302:2015. Список складено за порядком появи посилань у тексті дисертації. Всього в списку 163 джерела, у тому числі: 33 - українською та російською кирилицею та 130 – латиницею.

Зауваження щодо змісту дисертації. При рецензуванні матеріалів дисертаційної роботи Віталія Васильовича Невмержицького виникли наступні зауваження і запитання.

Перелік і суть зауважень:

- Бажано надати інформацію про час та умови виділення клінічних ізолятів мікроорганізмів.
- Бажано вказати дані про чутливість клінічних штамів мікроорганізмів до антибіотиків, хоча б основних груп.

Перелік і суть запитань, які виникли на етапі опонування дисертації:

1. Чому для Ваших експериментів було обрано саме вуглекислотний екстракт хмелю, а не якийсь інший?

2. Чи були серед використаних у Вашому дослідженні клінічних ізолятів мікроорганізмів поліантибіотикорезистентні штами? Якщо так, то якою була їх чутливість до біологічно активних сполук вуглекислотного екстракту хмелю, порівняно з антибіотикочутливими ізолятами?

3. Скажіть будь ласка, на якій фазі ранового процесу пропонується використання розробленої мазі з EXB?

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

За своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням отриманих результатів, дисертація **"Протимікробні властивості нових мазевих композицій на основі екстракту хмелю вуглекислотного"** є завершеною науковою працею, виконаною на сучасному рівні. Отримані результати достатньо науково обґрунтовані і підтверджують досягнення поставленої мети – розроблено мазеву композицію на основі екстракту хмелю вуглекислотного для підвищення ефективності лікування інфікованих ран.

Дисертаційна робота Віталія Васильовича Невмержицького є такою, що цілком відповідає вимогам Постанові Кабінету Міністрів України "Про порядок присудження наукових ступенів" від 24 липня 2013 року № 567 (із внесеними змінами) та у Наказі МОН України № 40 від 12.01.2017 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації", а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології

Івано-Франківського
національного медичного університету
д. мед. наук, професор

