

## **ВІДГУК**

**офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача  
кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного  
фармацевтичного університету МОЗ України**

**Філімонової Наталії Ігорівни**

**на дисертаційну роботу Саркіс-Іванової Владислави Вадимівни на тему  
«Антимікробна дія хіміотерапевтичних препаратів та фізичних чинників  
на різні форми існування популяції *Pseudomonas aeruginosa*», 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 кандидата медичних наук за  
спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія**

### **Актуальність теми дисертації.**

Результати останніх міжнародних багатоцентрових досліджень показали провідну роль грамнегативних бактерій, в особливості *Pseudomonas aeruginosa*, в етіології шпитальних інфекцій, гнійно-запальних захворювань, післяопераційних ускладнень, та ін. Інфекції, які викликає синьогнійна паличка, є небезпечними, іноді блискавичними, і можуть супроводжуватися високою летальністю, особливо у пацієнтів, які перебувають на штучній вентиляції легень, у хворих на лейкоз, муковісцидоз, осіб, які постраждали від опіків. Перший спалах синьогнійної госпітальної інфекції був зареєстрований ще у 1897 році. На даний час, бактерії є етіологічною причиною 21-39,7 % випадків нозокоміальних пневмоній, 11-18 % випадків інфекцій сечовивідних шляхів, 13 % випадків ранової інфекції і 5-13,8 % випадків інфекцій кровотоку. Визначено, що у разі виникнення септичних ускладнень синьогнійного генезу, летальність серед пацієнтів становить, за даними різних авторів, від 43,9% до 78,0%.

Цілий ряд механізмів адаптації та виживання, убіквітарність розповсюдження, здатність вегетувати навіть у оліготрофних умовах надають синьогнійній паличці у порівнянні з іншими бактеріями широкі можливості для реалізації колонізаційного та патогенного потенціалу. Наявність багаточисельних факторів вірулентності, у першу чергу ряду ферментів агресії:

гемолізину, нейрамінідаза, протеази трьох типів, еластаза, продукція антифагоцитарних факторів дозволяють бактеріям ухилятися від імунної системи господаря.

Окремої уваги заслуговує здатність штамів *P. aeruginosa* утворювати біоплівку на любых поверхнях, як біотичних так і абіотичних. На відміну від інших видів бактерій *P. aeruginosa* має здатність прикріплюватись на поверхні з поліетилену медичного призначення, що пов'язано з гідрофільністю клітинної стінки і продукцією біосурфактантів. Загалом, саме синьогнійну паличку розглядають як один із основних модельних об'єктів для дослідження загальних закономірностей функціонування мікроорганізмів у складі біоплівки. Стан біоплівки захищає бактеріальні клітини від дії імунологічних факторів, а також антимікробних агентів, що є суттєвою проблемою при етіотропній терапії інфекційних ускладнень.

Американське товариство фахівців з інфекційних хвороб включило синьогнійну паличку в групу «ESKAPE», до шести найпроблемніших з точки зору антибіотикорезистентності мікроорганізмів, які є провідною причиною нозокоміальних інфекцій у всьому світі, завдяки природній резистентності *P. aeruginosa* до декількох класів антибіотиків та високій здатності до селекції антибіотикостійких штамів. Роботами ряду українських дослідників показано стійке підвищення резистентності до основних антисиньогнійних препаратів клінічних штамів *P. aeruginosa* та спрогнозовано динаміку експоненційного зниження чутливості до антибіотиків у найближчому майбутньому.

Вищевикладене підтверджує перспективність та актуальність напряду дослідження В.В Саркіс-Іванової. Адже ефективних засобів, що впливають на процес утворення біоплівок синьогнійної палички та руйнують сформовані біоплівки, нині не існує. Контроль процесу утворення біоплівок в культурах *P. aeruginosa* шляхом відбору і застосування хімотерапевтичних препаратів, фізичних чинників та їх комбінацій може бути використаний для підвищення ефективності антибіотикотерапії при синьогнійній інфекції та/або деконтамінації медичного обладнання і інших об'єктів шпитального середовища. Саме цим задачам тематично відповідає представлена на рецензію дисертаційна робота.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами:**

Дисертація є складовою частиною науково-дослідних робіт Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України: «Дослідження особливостей взаємодій антимікробних пептидів з мішенями» № державної реєстрації 0113U001516; «Вивчення біологічних ефектів дії потоку релятивістських електронів», № державної реєстрації 0116U000865, що відповідають пріоритетними напрямами розвитку фундаментальної і прикладної медичної науки і спрямовані на вирішення актуальних проблем охорони здоров'я в Україні.

### **Наукова новизна та теоретичне значення дослідження.**

До найважливіших досягнень експериментальної частини роботи дисертанта, безумовно, слід віднести розкриття механізмів резистентності *Pseudomonas aeruginosa* шляхом узагальнення результатів дослідження антибіотикочутливості бактерій, які перебували у різних формах існування - у планктонній формі, стані формування біоплівки та сформованої біоплівки. Вказане послужило теоретичним підґрунтям пошуку комбінацій антибіотиків та катіонних поліпептидів, що мають синергідний протимікробний ефект та запобігають утворенню біоплівок штамів *Pseudomonas aeruginosa*, а також дослідження комбінованої дії фотосенсибілізатора (метиленового синього) і немонохроматичного фотодіодного опромінення як складових фотодинамічної терапії. На лабораторній моделі інфікованої штамами *P. aeruginosa* променевої виразки шкіри лабораторних щурів експериментально підтверджено ефективність запропонованого методу лікування та визначено, що ФДТ є ефективною проти полірезистентних штамів синьогнійної палички з високою здатністю до біоплівкоутворення.

У частині роботи, присвяченій пошуку ефективних методів боротьби з біоплівками, що контамінують об'єкти зовнішнього середовища, доповнено наукові дані щодо чутливості тест-штамів *P. aeruginosa* за впливу різних поглинутих доз релятивістських електронів. Вперше з'ясовано вектор та силу змін біологічних властивостей штамів *P. aeruginosa* за впливу сублетальних доз потоку релятивістських електронів та показано принципову здатність фізичного чинника впливати на процес біоплівкоутворення бактеріями.

## **Практичне значення результатів дослідження.**

Пошукувачем запропонована протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* (патент України на корисну модель № 82743). Застосування антибіотика, який в сублетальних концентраціях руйнує зовнішню мембрану бактерії, в комбінації з антибіотиком, який через резистентність сам по собі не є ефективним, розширює терапевтичні можливості і підвищують терапевтичну ефективність обох антибіотиків.

На підставі проведених досліджень розроблені практичні рекомендації щодо параметрів застосування ФДТ, що складається із двох етапів. На першому етапі на поверхню інфікованої променевої виразки наносять шар фотосенсибілізатора метиленового синього з експозицією 30 хв, після чого опромінюють фотонним випроміненням при довжині хвилі 630 нм протягом 30 хв. Другий етап здійснюється на 6-ту добу після першого сеансу ФДТ у разі відсутності повної елімінації мікроорганізмів після одного сеансу опромінення.

Теоретичні положення роботи використовуються у науково-педагогічному процесі при викладанні у Харківському національному медичному університеті, ДУ «Дніпропетровська медична академія України», Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова, ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія», Національному медичному університеті ім. О.О. Богомольця, про що свідчать акти впровадження результатів дисертаційної роботи.

## **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій.**

Поглиблений аналіз наукової літератури, проведений В.В Саркіс-Івановою за темою дослідження дозволив автору разом із науковим керівником сформулювати мету та завдання роботи, розробити методологічну структуру ходу виконання дисертаційного дослідження, вибрати адекватне методичне забезпечення і на високому сучасному науковому рівні виконати роботу, що представлена на рецензію.

Основні наукові положення обґрунтовані достатнім обсягом фактичного матеріалу: дослідження проведені на 117 штаммах *Pseudomonas aeruginosa*, вилучених з різних екоотопів; експериментальне вивчення фотодинамічного

впливу на штами *P. aeruginosa* проведено як *in vitro* так і *in vivo* на моделі променевої альтерації шкіри лабораторних щурів; опромінення електронним пучком штамів *P. aeruginosa* в модельних розчинах проведено в 12 режимах, що відрізнялись по величині енергетичного навантаження.

Використані при виконанні дисертаційного дослідження мікробіологічні, біологічні, фізико-хімічні, фізичні та математико-статистичні методи є інформативними та адекватними поставленим у роботі меті і задачам.

Вірогідність основних положень дисертаційного дослідження визначена високим науковим та методичним рівнем проведених досліджень та підтверджена статистичною обробкою результатів за допомогою сучасних методів варіаційної статистики, пара- та непараметричних методик. Висновки є логічним завершенням проведених досліджень і повністю ґрунтуються на матеріалах дисертаційної роботи. Вони аргументовані і відзначаються новизною та конкретністю.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових праць (3 одноосібно), серед них розділ у зарубіжній колективній монографії, 6 статей (5 – у фахових виданнях України, 1 – у міжнародному виданні, 5 включено до наукометричних баз), 1 патент на корисну модель, 1 галузеве нововведення у сфері охорони здоров'я та 11 тез доповідей у матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій та з'їздів.

Зміст автореферату відображає основні положення дисертації.

#### **Послідовність викладу і оцінка змісту дисертації.**

Текст дисертації викладений українською мовою на 155 сторінках машинописного тексту, відредагований, достатньо інформативно проілюстрований графічним матеріалом – представлено 20 таблиць і 7 рисунків. Структура роботи відповідає діючим вимогам до дисертаційних робіт і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури, додатків. Список літератури містить 255 літературних джерел, з них 80 кирилицею та 175 латиницею.

У вступі достатньо аргументовано представлено актуальність обраної теми дисертаційної роботи, визначено мету, задачі, об'єкт і предмет

дослідження. Приведені наукова новизна і практичне значення одержаних результатів дають підстави стверджувати, що роботу цілком правомірно можливо віднести до дисертацій, де постановочні задачі успішно вирішуються з їх теоретичним узагальненням і практичною реалізацією.

У огляді літератури здобувачем приведено основні дані щодо етіологічної значимості та антибіотикорезистентності актуальних штамів *P. aeruginosa*. Освітлено питання щодо процесу утворення мікроорганізмами біоплівок та охарактеризовано способи та засоби боротьби з процесом біоплівкоутворення *P. aeruginosa*. Вказано, що не зважаючи на достатній період вивчення біоплівок мікроорганізмів, ефективних засобів, що впливають на процес утворення біоплівок *P. aeruginosa*, та руйнують сформовані біоплівки нині не існує. Тому пошук фармацевтичних засобів, що окрім протимікробних властивостей володіють біоплівкоруйнуючими властивостями, є нині актуальною проблемою, що потребує нагального вирішення. У цьому сенсі перспективним є вивчення комбінацій хіміотерапевтичних засобів, фотосенсибілізаторів та опромінення, тощо.

Загальний обсяг огляду літератури відповідає діючим вимогам.

У другому розділі дисертаційної роботи наведено загальну характеристику об'єктів дослідження, їх походження, вказані застосовані для вирішення поставленої мети методи дослідження. Окремо представлена інформація стосовно об'єктів для експериментальної частини роботи.

У першому розділі власних досліджень (третій розділ дисертації) автором приведені результати дослідження антибіотикочутливості актуальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* у різних формах існування бактеріальної спільноти та охарактеризовано вплив комбінацій протимікробних засобів на біоплівку, що свідчить про успішне досягнення поставленого завдання: експериментально визначити протимікробну ефективність комбінацій антисиньогнійних препаратів та їх вплив на біоплівкоутворення штамів *Pseudomonas aeruginosa*.

Другий розділ власних досліджень (четвертий розділ дисертації) містить результати визначення впливу фотодинамічної терапії на біологічні властивості біоплівок штамів *Pseudomonas aeruginosa* та складається з двох підрозділів. У першому підрозділі представлені результати дослідження *in vitro* ефектів комбінованої дії фізичних та хімічних чинників (фотодинамічний вплив) на

біологічні властивості штамів *Pseudomonas aeruginosa*. Показано, що за впливу на мікробні клітини окремих складових комплексу фотодинамічної терапії (фотосенсибілізатор метиленовий синій і опромінювання над'яскравими світлодіодами у червоній ділянці оптичного спектра) бактерицидна дія не відмічена. Обробка мікроорганізмів фотосенсибілізатором з наступним світлодіодним опромінюванням, тобто вплив на мікроорганізми складових ФДТ (енергетична експозиція 30 – 60 Дж/см<sup>2</sup>), суттєво підвищувала бактерицидну активність, як при мінімальній, так і при більш високій щільності енергії. За результатами визначення біоплівкоутворюючої здатності неопромінених тест-штамів встановлено, що діапазон показників оптичної щільності екстрагованого барвника варіював від 0,3915 до 0,9083 од. За впливу сублетальної дози ФДТ – енергетична експозиція 30 Дж/см<sup>2</sup> вказаний діапазон звузився від 0,2992 до 0,7886 од. У 80 % штамів відмічено достовірне зниження біоплівкоутворюючої активності.

На підставі проведених експериментів *in vitro* були обрані оптимальні параметри дози щільності енергії та експозиції освітлення, що обумовило вибір застосування складових ФДТ для проведення дослідів *in vivo*, що викладено у другому підрозділі четвертого розділу дисертації. Лікування змодельованих променевих ушкоджень шкіри, інфікованих штамами *Pseudomonas aeruginosa*, за допомогою фотодинамічного впливу створює бактерицидний ефект, активує репаративні процеси у опроміненій ділянці та зменшує місцеве запалення, що призводить до загоювання виразки. Вперше експериментальним шляхом встановлено, що ФДТ є ефективною проти полірезистентних штамів синьогнійної палички з високою здатністю до біоплівкоутворення.

Результати дослідження впливу потоку релятивістських електронів на життєздатність та процес утворення біоплівки штамів *Pseudomonas aeruginosa* представлено у третьому розділі власних досліджень (п'ятий розділ дисертації). Слід зауважити, що роботи з визначення екологічної безпечності застосування електронного пучка мають світовий пріоритет.

Автором отримано нові наукові дані щодо чутливості тест-штамів *P. aeruginosa* за впливу різних поглинутих доз релятивістських електронів. Встановлено практично лінійну залежність доза-зниження кількості життєздатних бактерій. Показано, що бактериостатична післядія електронного

пучка спостерігалась при енергетичних навантаженнях від 0,8 до 3,8 кГр. Бактерицидний ефект спостерігався після опромінення тест-штамів дозами, починаючи з 4,0 кГр.

Здобувачем з'ясовано вектор та силу змін біологічних властивостей штамів *P. aeruginosa* за впливу сублетальних доз потоку релятивістських електронів. Вперше *in vitro* та *in vivo* показано зниження вірулентних властивостей тест-штамів, що отримали сублетальну дозу опромінення потоком релятивістських електронів. За впливу сублетальних доз фізичного чинника визначено пригнічення біоплівкоутворюючої здатності тест-штамів синьогнійних паличок у 1,7 – 6,6 разів.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів» здобувачем проведено логічне та доказове осмислення одержаних даних, що у подальшому привело до обґрунтування «Висновків» та «Практичних рекомендацій».

У Додатках представлена інформація щодо апробації результатів дисертаційної роботи та їх впровадження.

#### **Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення.**

При рецензуванні дисертації виникли деякі зауваження стилістичного характеру, які не впливають суттєво на узагальнену позитивну оцінку представленої роботи. До матеріалів автореферату необхідно внести інформацію щодо співвиконавців роботи з моделювання променевої виразки лабораторних тварин.

При беззаперечній позитивній оцінці дисертації, у рамках наукової дискусії, бажано було б мати відповідь пошукувача на наступні запитання:

1. Чому для експериментального дослідження дії ФДТ обрано модель інфікованих місцевих променевих виразок шкіри?
2. За якими критеріями при дослідженнях на змодельованій інфікованій променевій виразці шкіри піддослідних тварин встановлено перехід з гострої стадії до процесу загоєння?
3. Який механізм дії потоку релятивістських електронів на біоплівкоутворення бактерій?

#### **Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.**

Дисертаційна робота Саркіс-Іванової Владислави Вадимівни на тему «**Антимікробна дія хіміотерапевтичних препаратів та фізичних чинників**



на різні форми існування популяції *Pseudomonas aeruginosa*» є самостійною завершеною науково-дослідною працею, що містить нові науково обґрунтовані результати та вирішує одну з актуальних проблем сучасної медицини – удосконалення протимікробної терапії синьогнійної інфекції та дезінфекції поверхонь від біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*, що відповідає спеціальності 03.00.07 – мікробіологія. Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації у повній мірі відображені у наукових публікаціях та впроваджені у патенті на корисну модель.

За актуальністю та медико-соціальною значущістю теми, обґрунтованістю наукових положень і висновків, достовірністю та новизною отриманих результатів, повнотою їх викладу в опублікованих працях, оприлюднення на медичних форумах, практичною значущістю дисертаційна робота відповідає вимогам п.п. 9, 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567 зі змінами, а її автор Саркіс-Іванова В.В. заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Завідувач кафедри мікробіології,  
вірусології та імунології  
Національного фармацевтичного  
університету,  
доктор медичних наук, професор



Філімонова Н. І.

Підпис професора Філімонової Н.І. засвідчую

Провідний фахівець  
з питань кадрової роботи



Купіна О.В.