

## ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, професора,  
професора кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківського  
національного медичного університету МОЗ України

**Мінухіна Валерія Володимировича на дисертаційну роботу  
Христяна Геннадія Євгеновича на тему: "Протимікробні властивості  
нових композитних покриттів для стоматологічних імплантів", подану  
у спеціалізовану вчену раду Д 64.618.01 ДУ "ІМІ НАМН України" на  
здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю  
03.00.07 – мікробіологія, медицина**

**Актуальність обраної теми.** Дисертаційна робота Геннадія Євгеновича Христяна на тему: "Протимікробні властивості нових композитних покриттів для стоматологічних імплантів" стосується мікробіологічних аспектів одного із пріоритетних напрямків сучасної медицини - імплантології.

Розробка нанокомпозитних покриттів для стоматологічних імплантів є одним з науково-практичних напрямків, що швидко розвиваються. У всьому світі проводиться багато досліджень для модифікації поверхні імплантів з метою поліпшення їх остеоінтеграції та успішності довгострокового клінічного результату.

Незважаючи на досягнення в імплантології відомо, що біля 2 % імплантів не досягають ранньої остеоінтеграції, а загальний рівень їх відторгнення становить у середньому 7,7 % впродовж п'яти років після імплантації. Ключову роль у випадках невдач приживлення імплантів відіграють патологічні процеси мікробного генезу, визначені як періімплантні захворювання, що у підсумку призводять до втрати імпланту і таким чином, надають значну шкоду здоров'ю, емоційному та фінансовому стану пацієнтів.

У запалених періімплантних тканинах виявляється високий рівень пародонтальних патогенів, у тому числі *Fusobacteria* spp., *Spirochetes* spp., *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, а також *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* і *Candida* spp.

Лікування періімплантитів є досить складним і часто не приносить успіху, що обумовлено широкими асоціаціями патогенів, формуванням ними біоплівки та ускладненим доступом до інфікованих тканин.

Важливою сучасною стратегією є надання покриттю імпланту остеоінтегруючих і бактерицидних властивостей із здатністю запобігати адгезії мікроорганізмів та швидкому формуванню у них резистентності, на що спрямована дисертація Христяна Г.Є. і тому є актуальною та цілком відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки і техніки на період до 2020 року "Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань" згідно Закону України № 2519-VI від 09.09.2010 р. "Про внесення змін до Закону України "Про пріоритетні напрямки розвитку науки і техніки".

**Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.** Дисертаційна робота Геннадія Євгеновича Христяна виконана у рамках планової прикладної науково-дослідної роботи в лабораторії

протимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» «Теоретичне та експериментальне обґрунтування розробки нанокомпозитних покриттів на основі біополімерів та протимікробних засобів для медичних імплантів», № держреєстрації 0111U004731, в якій особисто автором (як співвиконавцем НДР) визначено протимікробні властивості експериментальних зразків покриттів імплантів щодо референтних тест-штамів та клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань.

Тему кандидатської дисертації затверджено на засіданні Вченої ради ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» від 30.11.2013 р. – 03.12.2013 р. протокол № 6.

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** У дисертаційній роботі на основі результатів експериментальних досліджень та їх теоретичних узагальнень вирішено наукове завдання щодо розробки нового композитного покриття для стоматологічних імплантів з метою підвищення ефективності профілактики періімплантних захворювань. Мікробіологічно обґрунтована медична перспективність покриття, яке характеризується достатньо вираженою антибактерійною та фунгіцидною активністю, пригнічуючою дією на адгезію мікроорганізмів, повільним формуванням резистентності у патогенів. Новизна наукових досліджень підтверджена одержаними від державного департаменту інтелектуальної власності МОН України 2 патенти на корисну модель, які впроваджено у практику охорони здоров'я у формі галузевих нововведень (Інформаційний бюлетень НАМН України. Київ, 2016. Вип. 41 та Інформаційний бюлетень НАМН України. Київ, 2017. Вип. 43).

**Теоретичне і практичне значення основних наукових положень, сформульованих у дисертації.** Дисертаційна робота Г.Є. Христяна має практичне значення і спрямована на розробку нового способу отримання модифікованого протимікробним засобом кальцій-фосфатного покриття для стоматологічних імплантів (патент України на корисну модель № 89955) та створенню нової технології отримання на металевому субстраті кальцій-фосфатного покриття з внесеним до його складу протимікробного лікарського засобу - 0,025-0,05 мас.% декаметоксину (№ держреєстрації 0615U000087), які впроваджено у практику охорони здоров'я у формі галузевого нововведення (Інформаційний бюлетень НАМН України. Київ, 2016. Вип. 41).

Отримані результати наукових досліджень щодо антимікробних властивостей нового зразку нанокомпозитного покриття на основі гідроксилапатиту із декаметоксином відносно домінуючих різновидів збудників періімплантних захворювань використовуються в навчальних програмах вищих медичних закладів та закладів післядипломної освіти МОЗ України: кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ "Дніпропетровська медична академія" (акт впровадження від 27.01.2018 р.), кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (акт впровадження від 05.03.2018 р.), кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт впровадження від 04.02.2018 р.).

***Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.*** Експериментальна робота виконана дисертантом у відповідності до мети та поставлених задач на сучасному науково-методичному рівні з використанням мікробіологічних, фізико-хімічних та математико-статистичних методів дослідження.

Г.Є. Христяном для виконання поставлених завдань використані референтні тест-штами мікроорганізмів та клінічні ізоляти збудників періімплантних захворювань, які відносяться до різних таксономічних груп. Для одержання нанокомпозитних покриттів дисертантом були використані відповідні реактиви і способи синтезу із застосуванням методу термодепозиції з системою охолодження.

Наукові положення та висновки сформульовані та обґрунтовані автором є достовірними, що забезпечується достатнім обсягом досліджень, їх кратністю, статистичною обробкою даних і логічною інтерпретацією результатів.

Отримані результати, що зіставлялись із даними вітчизняних та зарубіжних науковців, ілюстровані зведеними таблицями, що дозволило автору не тільки сформулювати аргументовані висновки, а й обґрунтувати перспективність розробки нових композитних покриттів для стоматологічних імплантів.

***Достовірність і новизна положень, висновків та рекомендацій.***

Достовірність основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих в дисертаційній роботі Г.Є. Христяна, ґрунтується на: достатньому обсязі виконаних тематичних експериментів; використанні загальноновизнаних методів досліджень (мікробіологічних, фізико-хімічних, математико-статистичних); достатньої кількості взятих в експерименті культур мікроорганізмів, поживних середовищ, лабораторного обладнання і посуду; повноцінної статистичної обробки отриманих результатів та їх об'єктивному аналізі. Наведено результати експериментів із урахуванням їх повторних відтворювань.

Отримані результати досліджень оброблено за допомогою відповідних статистичних методів. Дані представлено як середня арифметична величина та її стандартна похибка. При оцінюванні значень протимікробної активності досліджуваних зразків покриттів застосовувався дисперсійний аналіз. Рівень відмінностей оцінювався як статистично значимий при  $p < 0,05$ .

Чітко і зрозуміло представлено експериментальні дані у вигляді таблиць та рисунків. Дослідження виконано на обладнанні, що пройшло державний метрологічний контроль. Матеріали, які використані в дисертації, повністю відповідають вимогам первинної документації, розглянуті та затверджені комісією з біоетики.

Автором розроблено 18 зразків нових покриттів для стоматологічних імплантів на основі гідроксилапатиту та компонентів із протимікробними (хітозан, іони срібла, декаметоксин) та остеointегруючими (хітозан, колаген) властивостями.

Вперше доведено високу протимікробну активність зразків № 11 (хітозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 12 (хітозан 0,100 г/л, декаметоксин 0,025

г/л), № 17 (декаметоксин 0,025 г/л, колаген 0,300 г/л) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань. Визначено МІК, МБК та МФК для зразків цих покриттів.

Встановлено, що зразок покриття № 12 володіє найбільшим ефектом пригнічення адгезії штамів *E. coli* та *S. aureus*, і викликає повільне формування резистентності у клінічних штамів цих бактерій.

Вищезазначене дозволяє оцінити наведені Г. Є. Христяном основні положення, висновки та одержані результати досліджень, як достовірні.

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

Результати досліджень, основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації кандидатської дисертації Г. Є. Христяна обговорено на 11 наукових міжнародних конгресах, з'їздах, конференціях, опубліковано у 28 наукових роботах (2 - одноосібно), серед них 1 монографія, 9 статей (7 – у наукових фахових журналах України, 2 – у міжнародних виданнях, 5 – включено до міжнародних наукометричних баз, 2 патенти України на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 1 інформаційний лист, 3 нововведення.

Автореферат викладено на 23 сторінці машинописного тексту, містить 4 рисунки і 3 таблиці із дотриманням вимог МОН України. Автореферат складається із загальної характеристики дисертаційної роботи, основних положень змісту кожного її розділу з результатами досліджень та їх аналізом, висновків, списку опублікованих праць, анотацій українською, російською та англійською мовами. Матеріали автореферату є ідентичними дисертації, досить ґрунтовно розкривають основні її положення і дозволяють сформулювати повне уявлення про роботу в цілому.

***Структура, зміст і завершеність дисертаційної роботи.*** Кандидатська дисертація Г. Є. Христяна викладена на 137 сторінках і складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів власних досліджень, висновків і списку літератури. Робота містить 9 таблиць і 9 рисунків. Список використаної літератури включає 197 джерел, з них 55 кирилицею та 142 латиницею.

**У вступі** представлено актуальність наукового завдання щодо створення нових композитних покриттів для стоматологічних імплантів із протимікробними та остеоінтегруючими властивостями, зв'язок роботи з науковими програмами, 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 і опублікування останніх, а також відомості про обсяг та структуру дисертації.

**В огляді літератури**, який містить три підрозділи, детально описано сучасні аспекти створення і застосування імплантів у стоматології. Проаналізовано асоційовані з імплантацією захворювання та акцентовано увагу на провідну роль у виникненні постімплантаційних інфекційних ускладнень, таких мікроорганізмів, як *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida spp.* та інших. Продемонстровано, що традиційна тактика використання

протимікробних препаратів (антибіотиків, хіміопрепаратів та антисептиків) під час та після імплантації не завжди забезпечує досягнення очікуваного профілактичного та лікувального ефекту внаслідок недостатньої їх антибактерійної та протигрибової активності, здатності запобігати небажаній адгезії мікроорганізмів та швидкому формуванню резистентності у останніх.

За результатами аналізу літератури зроблено висновок, що виникнення постімплантаційних ускладнень мікробного генезу залишається актуальною медичною проблемою, а перспективним напрямком запобігання виникненню таких ускладнень є розробка нових типів покриттів для імплантів, до складу яких доцільно включати компоненти природного і синтетичного походження із протимікробними та остеоінтегруючими властивостями (хітозан, декаметоксин, іони срібла, колаген тощо).

**Розділ 2 “Матеріали та методи”** складається із 7 підрозділів, в яких наведено дані про нанокompatитні покриття на титанових пластинах. Наведено дані про кількість і походження типових та клінічних штамів мікроорганізмів. Представлено відомості щодо поживних середовищ, які були використані дисертантом для проведення досліджень. Повнота викладення автором фізичних та фізико-хімічних властивостей, мікробіологічних та математико-статистичних методів є цілком достатньою для оцінки обґрунтованості вибраних методів досліджень, їх сучасності з точки зору забезпечення якості проведення експериментів та можливості їх відтворення.

**У розділі 3 “Зразки розроблених нанокompatитних покриттів для стоматологічних імплантів та їх фізичні і фізико-хімічні властивості”** дисертантом наведено дані щодо створення 18 зразків нових покриттів для стоматологічних імплантів на основі гідроксилапатиту (ГА) та різних компонентів: хітозан (у концентраціях від 0,025 до 0,100 г/л), іони срібла (у концентрації 0,100 г/л), декаметоксин (у концентраціях 0,013 і 0,025 г/л), колаген (у концентрації 0,300 г/л) з використанням методу термодепозиції. Визначальною фізичною властивістю імплантів є морфологія поверхні покриттів. Представлені мікрофотографії показують пористу структуру покриттів з виразною рельєфністю поверхні, що забезпечує достатню здатність іммобілізувати та утримувати компоненти з протимікробною та біологічною активністю. За характеристиками пористості структури з виразною кристалічною рельєфністю поверхні (10-15×3-5 нм) та молярним стехіометричним співвідношенням Са/Р нові покриття відносяться до групи нанокompatитних із протимікробними та остеоінтегруючими властивостями.

**Розділі 4 “Протимікробна активність експериментальних зразків покриттів для стоматологічних імплантів”** складається із двох підрозділів. Вивчення протимікробної дії створених зразків покриттів №№ 1-18 проведено у два етапи. На першому етапі методом дифузії в агар (метод «колодязів») визначена протимікробна активність усіх зразків щодо референтних тест-штамів та клінічних ізолятів мікроорганізмів збудників періімплантних захворювань.

На другому етапі для найбільш перспективних зразків нових покриттів було визначено мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) методом двократних

серійних розведень у рідких поживних середовищах, а також мінімальні бактерицидні (МБК) і мінімальні фунгіцидні (МФК) концентрації шляхом дозованого висіву (0,1 мл) суспензій без ознак видимого росту на відповідні для кожного виду бактерій і грибів тверді поживні середовища з метою контролю виживання мікроорганізмів.

Дисертантом, визначено, що зразки композитних покриттів на основі ГА № 11 (хітозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 12 (хітозан 0,100 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 17 (декаметоксин 0,025 г/л, колаген 0,300 г/л) характеризуються найвищою протимікробною активністю ( $p < 0,05$ ) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників периімплантних захворювань, що належать до різних таксономічних груп - грампозитивних і грамнегативних, аеробних та анаеробних бактерій, а також грибів роду *Candida*.

Г. Є. Христян встановив, що для тест-штамів мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *E. coli* ATCC 25922, *P. gingivalis* ATCC 33277, *C. albicans* ATCC 885-653 значення МІК, МБК та МФК були відносно вищими ( $p < 0,05$ ) у зразків покриттів №№ 11 і 12 та становили: МІК для бактерій від  $(8,3 \pm 0,3)$  до  $(25,0 \pm 0,0)$  та від  $(4,2 \pm 0,2)$  до  $(16,7 \pm 0,1)$ , а для грибів -  $(33,3 \pm 0,3)$  і  $(25,0 \pm 0,0)$  мкг/мл, відповідно; МБК від  $(16,7 \pm 0,3)$  до  $(66,7 \pm 0,1)$  та від  $(12,5 \pm 0,0)$  до  $(33,3 \pm 0,1)$  мкг/мл, а МФК  $(50,0 \pm 0,0)$  і  $(41,7 \pm 0,2)$  мкг/мл, відповідно.

**У розділі 5 "Вплив нових покриттів для стоматологічних імплантів на адгезію мікроорганізмів"** представлено результати вивчення впливу відібраних за ефективністю протимікробної дії нанокompозитних покриттів для стоматологічних імплантів №№ 11, 12 та 17 на процес адгезії штамів мікроорганізмів різних таксономічних груп: *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923. Дисертантом встановлено, що композитні покриття №№ 1, 11, 12, 17 проявляють антиадгезивну дію щодо мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923. Рівень антиадгезивного впливу залежить від складу покриття. Найменше пригнічує адгезію як ешерихій, так і стафілококів (із зменшенням ІАМ на 25,0 та 21,7 %, відповідно) зразок монокомпонентного покриття № 1 - ГА. Автором визначено, що найбільшим ефектом ( $p < 0,05$ ) пригнічення адгезії зазначених мікроорганізмів володіє зразок покриття № 12, що підтверджується зменшенням величин ІАМ у порівнянні з контрольним зразком № 1 на 39,9 % і 27,4 %, відповідно.

**У розділі 6 "Швидкість формування резистентності у мікроорганізмів до перспективних зразків покриттів для стоматологічних імплантів"** представлено дані щодо швидкості формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 до дії зразків розроблених нанокompозитних покриттів №№ 11, 12 і 17, що різнились за якісним та кількісним складом компонентів із протимікробними та остеointегруючими властивостями (хітозану, декаметоксину та колагену), які показали відносно вищу рейтингову протимікробну та антиадгезивну активність. Дослідження швидкості формування резистентності до матеріалу покриттів проведено шляхом 30 послідовних пасажів вказаних тест-штамів на

живильних середовищах, що містили зростаючі суббактеріостатичні концентрації відповідних зразків покриттів.

Здобувачем встановлено, що найбільш повільне формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 спостерігалось до зразків покриттів №№ 11 і 12. Динаміка поступового зростання резистентності, як у ешерихій, так і у стафілококів, відмічалась з 5 до 25 пасажу із лінійно-подібним збільшенням МІК від 4 до 22 разів та подальшим більш інтенсивним її формуванням до 30 пасажу. Кінцевий рівень набутої ешерихіями та стафілококами резистентності відзначався збільшенням вихідного значення МІК зразку покриття № 11 у 28 і 32 рази, а № 12 - у 26-28 разів, відповідно.

**Висновки** включають стисле формулювання здобувачем наукових узагальнень, які повною мірою відображають теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи і вирішення завдань медичної мікробіології щодо розробки нового композитного покриття для стоматологічних імплантів з метою підвищення ефективності профілактики периімплантних захворювань. У висновках Г. Є. Христяном мікробіологічно обґрунтована медична перспективність покриття, яке характеризується достатньо вираженою антибактерійною і фунгіцидною активністю, пригнічуючою дією на адгезію мікроорганізмів та повільним формуванням резистентності у патогенів. Висновки сформульовано чітко і зрозуміло, їх послідовність і зміст логічно відображає завершеність дисертаційної роботи.

**Практичні рекомендації** щодо використання результатів дисертаційної роботи Г. Є. Христяна мають наступне значення: найбільш перспективний зразок композитного покриття для стоматологічних імплантів рекомендується для подальших досліджень з метою впровадження у виробництво і застосування в медичній практиці. Отримані результати наукових досліджень щодо антимікробних властивостей нового зразку нанокompозитного покриття на основі гідроксилапатиту із декаметоксином відносно домінуючих різновидів збудників периімплантних захворювань використовуються у вищих навчальних та закладах післядипломної освіти МОЗ України.

**Список використаних джерел** викладено на 25 сторінках із дотриманням чинних бібліографічних вимог і включає 197 джерело, з них 55 кирилицею та 142 латиницею.

**Відповідність дисертації спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради** за формулою спеціальності, напрямами досліджень і галуззю науки відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 та спеціальності 03.00.07 – мікробіологія, медичні науки.

**Зауваження щодо змісту дисертації.** При рецензуванні матеріалів дисертаційної роботи суттєвих зауважень до змісту дисертації немає, але виникло декілька запитань.

Запитання:

1. У дисертаційній роботі досліджувались властивості покриттів, сформованих методом термодепозиції, на титанових пластинах. Скажіть будь ласка, чи цей метод дозволяє підвищити їх антимікробні властивості?
2. Чи проводились експериментальні дослідження щодо вивчення терміну збереження протимікробних властивостей нанокompозитними покриттями?

**Висновок.** За своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням отриманих результатів, дисертація є завершеною науковою працею, виконаною на сучасному методологічному рівні. Отримані обґрунтовані результати в сукупності вирішують актуальну наукову проблему медичної мікробіології.

Дисертаційна робота є такою, що цілком відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567 із внесеними змінами згідно з Постановою КМ України № 656 від 19.08.2015 року, а здобувач заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія.

Професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. професора Д.П. Гриньова  
Харківського національного медичного університету  
доктор медичних наук, професор



В.В. Мінухін