

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Хаткова Эдуарда Магомедовича
«Микробиоценоз кожи при лечении акне ниосомальным антимикробным
гелем» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность исследования. Акне относится к распространенным заболеваниям кожи. Развитие акне связано с дисбалансом ряда функций организма, однако непосредственное этиологическое значение при этом имеют микроорганизмы – представители нормальной микрофлоры, а также отдельные патогенные виды, которые могут транзиторно контаминировать кожные покровы и, при определенных условиях, становиться главной причиной воспалительного процесса.

В лечении акне, как известно, широко применяют антибактериальные препараты. Значительный вклад в разработку современных антибактериальных средств вносят новые технологии их изготовления, позволяющие изменять фармакокинетику лекарственных веществ, придавать им более пролонгированное и целенаправленное, по отношению к мишеням, действие.

Создание таких препаратов, обладающих трансдермальной активностью, для местной терапии акне, микробиологическая и клиническая оценка их эффективности является важной научно-практической задачей. Настоящая диссертация, выполненная в этом направлении, несомненно, актуальна.

Структура диссертации. Диссертация традиционна по форме: изложена на 141 странице компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав собственных исследований, заключения, выводов. Список литературы включает 288 источников отечественных и иностранных авторов. Текст диссертации иллюстрирован 26 рисунками и 5 таблицами.

Во введении автор дает обоснование актуальности выбранного направления исследования, формулирует его цели и задачи.

Целью работы являлось изучение микробиоценоза кожи и влияние на него антимикробного наногеля с растительными экстрактами, инкапсулированными в ниосомы кремнийорганической природы. Задачи адекватны поставленной цели. Они предполагали выполнение ряда этапов, таких как изучение микрофлоры кожи выборочной группы пациентов, страдающих акне, определение чувствительности преобладающих микробных видов к растительным экстрактам с ожидаемой антибактериальной активностью и далее, разработку ниосомальной формы экстрактов и исследование ее антибактериального действия на больных акне. Все вместе это определило комплексный характер диссертационной работы.

Научная новизна исследования не вызывает сомнения. Она представлена в виде нескольких положений, отражающих полученные в работе новые фактические данные, относящиеся к разработке и микробиологической оценке антибактериального действия экстрактов, полученных из зверобоя, конского щавеля, солодки, ромашки аптечной, приготовлению на их основе ниосомального геля и оценке его эффективности. Научную новизну исследования подчеркивает заявка автора на патент «Наружное средство для лечения акне на основе кремнийорганических наноконтейнеров». К сожалению, до положительного решения Роспатента, которое на данный момент времени еще не получено, она не может служить подтверждением приоритетности выполненной разработки.

Положения, выносимые на защиту, в целом, отражают основное содержание полученных данных. Вместе с тем, считаю, что положение 2 неточно по сути, так как собственно определение «уровня образования микробных форм, резистентных к антимикробному действию растительных экстрактов» в работе не проводилось. Об этом можно судить только опосредованно, при сравнении результатов ингибирующего действия экстрактов на исследуемые микроорганизмы.

Глава 1. Обзор литературы состоит из трех разделов, в которых приведен материал научных публикаций и изложены взгляды различных исследователей.

дователей на проблему развития акне. Подробно рассмотрена роль микробиоценоза кожи и отдельных ее представителей в формировании очагов воспаления, принципы лечения различных форм заболевания, эффективность применения известных антибактериальных препаратов.

В разделе, касающемся использования лекарственных растений, много нужной информации, относящейся к характеристике лечебных свойств и особенностей их применения. Однако нельзя не отметить, что приведенный материал в основном отражает вопросы общего лекарственного применения растений при различных заболеваниях и в меньшей степени – вопросы их местного использования, в том числе, при акне.

Значительное внимание отведено вопросам создания принципиально новых лекарственных препаратов на основе технологии микроинкапсулирования, отражены современные тенденции и перспективы ее развития. Подробно рассмотрены возможности применения в качестве носителей биологически активных веществ липосом, а также ниосом. Материал обзора имеет непосредственное отношение к теме диссертации, подтверждая ее актуальность, в нем цитируются многочисленные работы, в том числе, опубликованные в последние годы. Обзор, в целом, производит хорошее впечатление своей информативностью. На мой взгляд, этой главе недостает общего заключения, содержащего законченное обоснование выбранного направления исследования.

Глава 2. Материалы и методы. При анализе раздела «Материалы и методы», следует отметить, что спектр методических приемов, использованных автором в работе, весьма широк и включает, наряду с бактериологическими, также методы приготовления растительных экстрактов, технологические приемы приготовления антимикробного ниосомального геля, методы определения токсичности полученных композиций на модели экспериментальных животных, гистологические методы, методы клинической оценки эффективности применения антибактериальных рецептур и, наконец, методы

статистической обработки материала. Все методические приемы описаны весьма детально, тем не менее, в их изложении есть ряд неточностей.

Не совсем понятно, в частности, какой именно схемы идентификации микроорганизмов придерживался автор, так как при этом он ссылается и на Берги, и на другие отдельные источники, и на общепринятые утвержденные нормативно-методические документы (стр. 52 - 55). Далее, в случае определения концентрации стандартных бактериальных суспензий, правильнее указывать ее в м.к./мл, а не в кое/мл, что принято при точном определении количества живых микробных клеток (стр. 54). Помимо этого, на мой взгляд, в главе приведен материал (раздел 2.2 «Обоснование выбора лекарственных растений, обладающих антимикробной активностью»), который является для нее излишним по своей сути. Все, что касается его содержания, подробно рассмотрено в обзоре литературы. По-видимому, подобный раздел мог бы иметь место в «материалах и методах», если бы отражал какие-то собственные методические приемы оценки свойств этих растений, например их активных компонентов. Целесообразнее, думаю, здесь было бы указать (уверена, что автор располагает таким материалом), где и как было собрано растительное сырье, как хранилось, отвечало ли оно требованиям экологической чистоты, условиям сохранения активных компонентов и т. д. Ведь все эти факторы, когда речь идет о медицинском использовании растений, имеют существенное значение.

Материалы собственных исследований автора представлены в двух последующих главах.

Глава 3. Основное место в этой главе отведено определению чувствительности микроорганизмов, выделенных от пациентов с акне, к экстрактам лекарственных растений (ромашки, зверобоя, конского щавеля, солодки). Предварительно автором был разработан весь процесс получения экстрактов, начиная от выбора экстрагента и заканчивая процедурой экстрагирования, с учетом различий в физико-химических свойствах растений. Опытным путем были подобраны наиболее подходящие растворители, оптимальный темпера-

турный режим и необходимая продолжительность экстрагирования. При этом учитывали и контролировали целый ряд других факторов, способных оказывать влияние на качество получаемого продукта. В результате автором была предложена технологическая схема, позволяющая проводить получение экстрактов в несколько этапов с использованием на каждом этапе разработанных методических приемов.

При определении состава основных микроорганизмов, участвующих в развитии акне, была показана типичная для таких больных картина микробного пейзажа кожи с преобладанием в изолятах стрептококков, а также *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Исследование чувствительности выделенных микроорганизмов было проведено к экстрактам двух типов: водным и пропиленгликолевым с использованием диско-диффузионного метода. Результаты суммированы в таблице 1 (стр. 73, 74) и на рисунках (стр. 74, 75, 76, 77). Анализируя эти результаты, автор отмечает, что пропиленгликолевые экстракты, в общем, эффективнее ингибируют рост тестируемых видов, при этом максимально выраженная зависимость зон подавления роста от дозы препарата выявляется у водных экстрактов зверобоя (10-16 мм) и корня солодки (9-17 мм). Отчетливый антибактериальный эффект демонстрируют также водные экстракты зверобоя и конского щавеля. Судя по данным, приведенным в таблице 1 (стр. 73, 74), чувствительность исследуемых микроорганизмов варьирует в зависимости от вида, хотя автор не акцентирует на этом внимание. Если оценивать, например, действие пропиленгликолевого экстракта зверобоя, то он в наибольшей степени задерживает рост *St. aureus* (10 - 16 мм), менее чувствительными можно считать *St. epidermidis* (10 - 14 мм) и затем *Streptococcus spp.* (10 - 12 мм). Показатели ингибирования этих микроорганизмов водным экстрактом конского щавеля также подчеркивают большую чувствительность *St. aureus*.

Вместе с тем, в ряде случаев рассматриваемых автором, различия в диаметре зон задержки роста находятся в очень узких границах (9-10 мм, 10-11 мм), что может быть свидетельством относительной резистентности куль-

туры, выявляемой в пределах тех концентраций экстрактов, которые были использованы (5-10%). Не совсем ясно, является ли установленная антимикробная активность испытанных экстрактов предельной или она может быть увеличена при повышении концентрации экстракта. По-видимому, полезным здесь было бы использование стандарта в виде показателя ингибирующего эффекта какого-либо активного вещества, входящего в состав экстракта.

Необходимо отметить, что оценивая показатели «чувствительности-резистентности» микроорганизмов к лекарственным экстрактам, автор допускает неточности в использовании самого термина «резистентность». Так на стр. 77, где приведены данные по ингибированию роста *St. epidermidis* экстрактом конского щавеля, отмечено, что в 1 % концентрации он задерживает рост, а в концентрации 5 и 10 % – нет. Полученный результат автор интерпретирует дословно «как увеличение концентрации конского щавеля до 5 и 10 % приводит к резистентности *St. epidermidis*». Трудно представить, чтобы доза вещества в меньшей концентрации вызывала подавление роста, а в большей – нет, за счет тотальной резистентности всей популяции (ведь речь идет о концентрации 1×10^8 м.к./мл). Очевидно, в случае формирования резистентности в зоне задержки роста должны были появиться изолированные колонии.

Примечательно, что приведенные в этой главе результаты определения ингибирующего действия экстрактов растений в отношении представителей рода *Enterobacteriaceae*, четко указывают на их большую, по сравнению с микрококками, чувствительность к пропиленгликолевому экстракту зверобоя (30-37 мм в сравнении с 10-16 мм). К сожалению, однозначное восприятие описываемых фактов затрудняет недостаточная информативность рисунков (стр. 74-77, 81), так как на них не указан диаметр зон задержки роста, на основании которых проводится весь анализ определения чувствительности.

Глава 3 завершается небольшим заключением, в котором автор обоснованно отмечает более выраженную антибактериальную активность трех исследованных экстрактов: 10% водного экстракта зверобоя, 5% пропиленгли-

колевого экстракта солодки и 5% водного экстракта конского щавеля, рассматривая их как перспективные компоненты для приготовления ниосомального геля. Вызывает возражение следующая часть заключения по главе: «при изучении возможности формирования устойчивости условно-патогенных микроорганизмов ... к антимикробному действию растительных экстрактов также установлена низкая частота резистентных форм». Во-первых, выявленная автором резистентность микроорганизмов к растительным экстрактам, в первую очередь это относится к *St. epidermidis*, является их исходной характеристикой, а не результатом воздействия растительного экстракта; во-вторых, методические подходы, использованные автором при исследовании «чувствительности-резистентности» недостаточны, чтобы устанавливать частоту формирования резистентных форм. Хотелось бы услышать собственное мнение автора по обсуждаемому вопросу.

Глава 4 посвящена изучению антимикробной эффективности ниосомального геля при лечении больных акне. Первый раздел главы касается биотехнологии приготовления ниосомального геля: дано описание фаз конструирования ниосом оптимального размера, включения в них растительных экстрактов для получения наночастиц с определенным содержанием иммобилизируемого вещества, методических приемов формирования структуры геля и т. д. Итогом этого раздела работы стало получение ниосомального геля с инкапсулированными растительными экстрактами.

Последующее изучение антимикробных свойств геля проводили сравнивая их с активностью растительных экстрактов (раздел 4.2). Автор приводит данные, указывающие на отчетливое, в течение 8 недель наблюдения, снижение антибактериальной активности пропиленгликолевого и водного экстрактов зверобоя, более выраженное при хранении при комнатной температуре. При этом ингибирующая активность экстракта зверобоя в ниосомальном геле снизилась в гораздо меньшей степени (38 и 17 % соответственно). Температура (+3) – (+5) °С позволяла сохранять активность ниосомальных препаратов на еще более высоком уровне (95 %).

Приведенные результаты вполне убедительны. Однако заключение автора относительно «низкой частоты образования резистентных форм», теперь уже к антимикробному действию ниосомальных препаратов, как и в главе 3, может носить только предположительный, а не утвердительный характер.

Экспериментальная оценка трансдермальной проникающей способности ниосом (раздел 4.3) представляет собой законченное гистологическое исследование, выполненное на модели белых крыс. Хорошо иллюстрированный материал отчетливо демонстрирует различия исследуемых гистологических признаков в группах сравнения, подтверждая высокую проникающую способность сконструированных наночастиц, которые проводят маркерный краситель (трипановый синий) через все слои кожи, вплоть до ее глубоких структур.

Заключительный раздел работы (4.4) посвящен изучению эффективности полученного ниосомального геля для лечения больных акне. В клиническом испытании на выборочной группе пациентов показана более выраженная эффективность нового сконструированного автором ниосомального препарата по сравнению с известным антибактериальным гелем – бензамицином. Отмеченная в этом исследовании клиническая эффективность ниосомального геля в отношении как воспалительных, так и невоспалительных элементов кожи, по мнению автора, является свидетельством дополнительного антибактериального действия самих ниосом, точнее, кремнийорганических соединений, входящих в их состав. В связи с этим возникает вопрос, какие есть подтверждения этому, кроме Ваших собственных наблюдений.

В заключении кратко подведены итоги выполненной работы. Диссертацию завершают выводы, которые логически следуют из представленных экспериментальных материалов, и практические рекомендации по их использованию. Необходимо отметить, что формулировка вывода 4 «при изучении возможности формирования устойчивости ...установлена низкая частота образования резистентных форм...» не может быть признана корректной, так

как она недостаточно обоснована имеющимися результатами исследования, что было отмечено ранее при обсуждении материалов главы 3.

Однако, в целом, большой объем и содержание проведенных исследований, их интерпретация, правильность выбора методических подходов и технологических решений не оставляют сомнения в достоверности представленных в диссертации данных. Практическая значимость диссертации состоит в отработке технологии экстрагирования лекарственных трав с антимикробным действием, разработке технологии инкапсулирования полученных экстрактов в ниосомы, разработке фаз приготовления и рецептуры антимикробного ниосомального геля с растительными экстрактами. Эффективность препарата апробирована на больных акне. Разработаны технические условия для производства препарата на базе ООО НПО «Технология».

Замечания, сделанные при рецензировании диссертации, не являются принципиальными для общей положительной оценки выполненной работы. Анализ материалов диссертации свидетельствует, что задачи, поставленные автором, решены в полном объеме и цель исследования, которая сформулирована как «изучение микробиоценоза кожи и влияние на него антимикробного наногеля с растительными экстрактами, инкапсулированными в ниосомы кремнийорганической природы», достигнута. Научные положения, выводы и рекомендации, в достаточной мере подтверждены фактическим материалом.

Автореферат диссертации полностью отражает содержание работы. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 4 – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Все изложенное позволяет заключить, что диссертация Эдуарда Магомедовича Хаткова «Микробиоценоз кожи при лечении акне ниосомальным антимикробным гелем» является законченной научно-квалификационной работой, в основу которой положен большой фактиче-

ский материал по разработке перспективного направления, касающегося создания и оценки антимикробной активности ниосомального геля с растительными экстрактами для лечения акне.

Таким образом, представленная диссертация по актуальности проблемы, уровню методических подходов для ее решения, научно-практическому значению результатов соответствует критериям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., как завершенная научно-квалифицированная работа, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в области микробиологии, а ее автор Хатков Эдуард Магометович заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

Меринова Людмила Константиновна,
доктор медицинских наук, профессор,
ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора,
заведующий отделом микробиологии
400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7.
Тел.: (8442) 37-37-74; E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

« ____ » _____ 2015 г. _____ Л. К. Меринова

Подпись Л.К. Мериновой заверяю
Начальник отдела кадров
ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора

« ____ » _____ 2015 г. _____ Н. В. Бяхова