

ВІДЗИВ

офіційного опонента професора Горчакової Надії Олександрівни
на дисертаційну роботу Кавушевської Наталії Сергіївни
«Фармакологічне дослідження гелю на основі лізоциму для лікування
гінгівітів та стоматитів»,
представлену до Спеціалізованої Вченої Ради Д 26.550.01
при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Актуальність обраної теми дисертації. Одними з найбільш поширених запальних захворювань слизової оболонки порожнини рота вважають гінгівіти і стоматити, при яких підвищується чутливість тканин до мікробних агентів. При цих захворюваннях також зростає вміст імунологічних маркерів запалення та показників оксидативного стресу. Для лікування гінгівітів і стоматитів призначають різні протимікробні засоби, які здійснюють етіотропний, патогенетичний і симптоматичний вплив. Більшість існуючих препаратів мають або антибактеріальну, або протизапальну, або репаративну дію. Існуючі препарати лізоциму можуть проявляти мультифакторну активність. На міжнародному ринку препарати лізоциму представлені у формі таблеток для розсмоктування, ліофілізатів для приготування ін'єкційних розчинів, рідин для полоскань та примочок, а також у складі зубних паст. Вищезазначені лікарські форми не забезпечують достатнього ступеню біодоступності лізоциму. Пропозиція застосування лізоциму у формі гелю може поліпшити розподілення речовини на слизовій оболонці порожнини рота, забезпечуючи його високу біодоступність та запобігаючи розмиванню засобу слиною. Тому дисертаційна робота Кавушевської Наталії Сергіївни є актуальною та своєчасною, тому що експериментально обґрунтовує ефективність гелю «Лізостом» на основі лізоциму гідрохлориду

при експериментальному стоматиті та гінгівіті, які є найбільш поширеними стоматологічними захворюваннями слизової порожнини рота.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій, сформованих в дисертації, достовірність, новизна. Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної програми Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне дослідження біологічно-активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх використання в медичній практиці» (№ держреєстрації 0103U000478). Дисертаційна робота викладена на 142 сторінках комп'ютерного тексту (основний обсяг становить 118 сторінок) та складається зі вступу, огляду літератури, описання матеріалів і методів дослідження, 5 розділів особистих досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел у кількості 233 (з них 179 кирилицею, 54 латиницею). Робота проілюстрована 15 рисунками та 26 таблицями. Огляд літератури «Сучасні уявлення про етіологію та патогенез запальних захворювань пародонту» складається з 4 підрозділів: «Етіологія та патогенез гінгівіту та стоматиту», «Роль лізоциму в збереженні гомеостазу порожнини рота», «Основні принципи фармакотерапії гінгівітів та стоматитів», «Сучасний арсенал фармацевтичних препаратів на основі лізоциму».

В роботі застосовані сучасні фармакологічні, патофізіологічні, фізико-хімічні, мікробіологічні, імунологічні, біохімічні, морфологічні, морфометричні та статистичні методи дослідження.

Розділ 3 присвячений визначенню ефективної дози та вивченню показників нешкідливості нового гелю на основі лізоциму гідрохлориду. Ефективна доза гелю на основі лізоциму була визначена на моделі термічної виразки слизової оболонки порожнини рота щура. На 4 добу експерименту вимірювали площу опікової рани, визначаючи зміни. В результаті проведених розрахунків за методом Штабського Б.М. встановили ефективну дозу гелю, що склала 3 мг/кг, яку застосовували і в подальших дослідженнях.

Надалі була вивчена гостра токсичність гелю «Лізостом» при внутрішньошлунковому та епікутанному введенні, а також нанесенні на слизову оболонку порожнини рота в дослідях, проведених на білих нелінійних мишах-самцях та щурах-самцях. Експериментально доведено, що гель «Лізостом» не виявляє токсичної дії, тому що при внутрішньошлунковому введенні, епікутанному нанесенні та нанесенні на слизову оболонку порожнини рота в дозах від 50 мг/кг до 1000 мг/кг летальності експериментальних щурів і мишей не спостерігалось. Визначити LD_{50} не вдалося, оскільки всі тварини до кінця експерименту залишилися живими. Згідно з класифікаційними таблицями гель «Лізостом» був віднесений до VI класу токсичності. Дослідження місцевоподразнювальної дії гелю «Лізостом» проводили через 30 хвилин, 1, 4, 24 години після обробки ним слизової оболонки порожнини рота щурів. Встановили, що гель «Лізостом» практично не виявляє подразнювальної дії при нанесенні на слизову оболонку порожнини рота.

В розділі 4 представлені дані щодо фармакологічного вивчення стоматологічного гелю «Лізостом». Спочатку досліджували антиексудативну активність гелю «Лізостом». Антиексудативну дію вивчали на моделі карагенінового набряку стопи, який моделювали на білих нелінійних щурах-самцях. Запальний процес у кінцівках щурів характеризувався збільшенням об'єму стопи, який зберігався протягом експерименту в контрольній групі. На моделі карагенінового набряку стопи гель «Лізостом» проявляв виражену протизапальну дію, зменшуючи вираженість набряку стопи (-43,5%). Гель «Лізостом» за результатами досліджень виявляв високу антиексудативну активність та перевищував за ефективністю препарат-порівняння гель «Метрогіл Дента» на 12,6%. Визначення антимікробної властивості гелю «Лізостом» проводили, застосовуючи 12 клінічних штамів мікроорганізмів. Дослідження протимікробних властивостей гелю «Лізостом» по відношенню до клінічних ізолятів показали, що препарат володіє протимікробною активністю по відношенню до аеробних мікроорганізмів *Staphylococcus*

epidermidis, Streptococcus pyogenes, Enterococcus faecalis, Echerichia coli діаметри зон затримки росту складали 19-22 мм, для анаеробних мікроорганізмів Prevotella melaningenlea, Fusobacterium necrophorum, Peptostreptococcus anaerobis, Parfiromonas sp., де діаметри зон затримки росту складали 20-22 мм. Помірну антибактеріальну дію виявлено у відношенні до Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Echerichia coli, Klebsiella pneumoniae, Candida albicans, де діаметри зон затримки росту дорівнювали 15-20 мм. Порівняльний аналіз антимікробної активності тест-штамів та клінічних ізолятів мікроорганізмів з референт препаратом показав, що гель «Лізостом» не поступається за специфічністю гелю «Метрогіл Дента». Завдяки протимікробній активності досліджуваного препарату реалізується додатково протизапальна, ранозагоювальна дія. Дослідження репаративної активності гелю «Лізостом» проводили на моделі експериментального ерозивно-виразкового стоматиту, який викликали одноразовою аплікацією натрію гідроксиду. Лікування проводили на другий день після відтворення патології. Протягом експерименту до уваги брали швидкість зміни площі ерозивно-виразкового пошкодження слизової оболонки ротової порожнини під дією хімічного подразника, показники крові (гемоглобін, еритроцити та лейкоцити), ректальної температури, динаміки маси тіла. Реєстрацію показників проводили щоденно. Вже на першу добу після моделювання стоматиту у щурів розвивався важкий ерозивно-виразковий стоматит з набряком ясен, тотальною гіперемією, серозними нальотами. Крім того, в ділянці перехідної складки нижньої щелепи спостерігалася виразка на місці дотику ватного тампона, змоченого в луг. Загальний стан тварин характеризувався в'ялістю, ректальна температура підвищувалася. Протягом перших 5 діб спостерігалася тенденція до зниження маси тіла, пригнічення інтересу до їжі, води. На фоні подібних змін щурам почали наносити гель «Лізостом» та препарат-порівняння «Метрогіл Дента». На 3 добу експерименту під впливом лізостому площа виразки зменшилась на 52,6%, а під впливом «Метрогіл Дента» на 46,1%. На 5 добу під впливом «Лізостому»

площа виразки зменшилась на 90%, під дією «Метрогіл Дента» на 82,2%. Ректальна температура нормалізувалась, залишилися незмінними показники крові. На 7 добу у всіх тварин під впливом «Лізостому» повністю загоїлась виразка, а у щурів, яких лікували «Метрогіл Дента», залишилася ерозія по контуру виразки та гіперемія. Лейкоцитоз зберігався. Дослідження на 10 день встановили нормалізацію картини крові щурів, як при застосуванні «Лізостому», так і «Метрогілу Дента». Була встановлена більш виражена репаративна дія «Лізостому» порівняно з впливом «Метрогіл Дента». Саме гель «Лізостом» зменшував набряк і гіперемію, знижував прояви запалення, ректальну температуру, вміст лейкоцитів в крові, сприяв швидкій епітелізації порівняно з референт-препаратом, покращував загальний стан тварин. В зв'язку з тим, що при гінгівітах і стоматитах спостерігається кровотеча, вивчали гемостатичні властивості гелю «Лізостом». В ході дослідження встановили, що гель скорочував тривалість кровотеч в мікросудинах щурів на 24,3% після одноразового нанесення. Амінокапронова кислота мала вищі показники порівняно з гелем «Лізостом», що характеризує його помірну гемостатичну дію. Показано, що гель «Лізостом» мав не тільки гемостатичну активність, скорочуючи тривалість кровотечі, але незначно підвищував агрегаційну здатність тромбоцитів. Для підтвердження ефективності лікування експериментального гінгівіту і стоматиту були проведені гістологічні дослідження.

Розділ 5 надає морфологічну оцінку ефективності гелю «Лізостом» при експериментальному гінгівіті і стоматиті. Після лікування гелем «Лізостом» при експериментальному гінгівіті слизова ділянка підборіддя щурів гістологічно дорівнювала нормі, не спостерігалися явища гострого альтернативного запалення. У більшості щурів, які лікувалися «Метрогіл Дента», на ділянці підборіддя слизова мала нормальний вигляд. Гель «Лізостом» сприяє зменшенню виразності гострого альтернативного запалення тканин слизової рота та акантозу, розростанню епітеліального пласта, деструкції епітеліальних клітин і строми слизової оболонки та за

лікувальним ефектом не поступався препарат «Метрогіл Дента». Гістологічне дослідження слизової оболонки порожнини рота при експериментальному стоматиті і під впливом гелю «Лізостом» показало, що його застосування не усувало дефекти слизової оболонки, але розповсюдженість завдовжки цих дефектів була зменшена. Менш виразними були і патологічні зміни морфоструктури ясен щурів, яких лікували гелем «Лізостом», лише у 20% щурів з краю вільної ясни спостерігалися поодинокі дрібні виразки. Терапевтичний ефект гелю «Лізостом» при експериментальному стоматиті не поступався лікувальній дії препарату «Метрогіл Дента», сприяв зменшенню зонального процесу, прискорював загоєння дефектів слизової оболонки, зменшував виразність альтеративно-запальних змін та проявам гіпертрофічних розростань епітелію.

Розділ 6 присвячений впливу стоматологічного гелю «Лізостом» на деякі механізми запалення при експериментальному гінгівіті. Встановлено, що маркерами виразності запального процесу при гінгівіті. Є співвідношення прозапальних та протизапальних цитокінів, а застосування гелю «Лізостом» веде до нормалізації системи перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту на 5 добу застосування та перевершує за специфічністю дії препарат порівняння «Метрогіл Дента». Лікування гелем «Лізостом» викликає нормалізацію кислотно-лужної рівноваги та мобілізацію захисних механізмів м'яких тканин пародонту, які проявляються нормалізацією кислотно-лужного стану артеріальної крові експериментальних щурів. Препарат порівняння «Метрогіл Дента» поступається за специфічністю дії стосовно вищезазначених показників. Застосування гелю «Лізостом» при експериментальному гінгівіті сприяє підвищенню морфофункціональної активності фібробластів, активізації пародонту, про що свідчить збільшення показника РНК/ДНК в 1,7 рази у порівнянні контрольною патологією.

В розділі 7 надані деякі механізми протизапальної дії стоматологічного гелю «Лізостом» при експериментальному стоматиті. При

експериментальному стоматиті гель «Лізостом» нормалізує цитокіновий статус. Нанесення гелю «Лізостом» при експериментальному стоматиті сприяло зменшенню вмісту протизапальних цитокінів подібно змінам при гінгівіті (ФНП-альфа, гама-ІФН, ІЛН), а також співвідношення ФНП-альфа/ІЛН та гама-ІФН/ІЛН. Препарат нормалізував показники прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та діяв позитивно на показники кислотно-лужної рівноваги. Під дією референт-препарату «Метрогіл Дента» процес нормалізації протікав менш інтенсивно та у відповідні терміни мав нижчі показники активності імунної системи та прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу порівняно з гелем «Лізостом». Стан морфофункціональної активності фібробластів та показник відношення РНК/ДНК, які наближалися до нормальних значень під впливом препарату як при гінгівіті, так і при стоматиті визначали ефективність лікування, перевершуючи за специфічністю дії «Метрогіл Дента». Гель «Лізостом» при експериментальному стоматиті зменшував генерацію вільних радикалів, нормалізував прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз. При експериментальному стоматиті гель «Лізостом» призводив до нормалізації кислотно-лужної рівноваги артеріальної крові експериментальних щурів та перевершував препарат порівняння «Метрогіл Дента».

В розділі «Узагальнення та аналіз отриманих результатів» диференційовано обговорюються результати досліджень гелю «Лізостом», розкриваючи його ефективність при експериментальному гінгівіті і стоматиті. Головний зміст роботи висвітлений у висновках.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено дослідження нового стоматологічного гелю «Лізостом» на основі лізоциму гідрохлориду. Встановлено, що гель «Лізостом» виявляє антимікробну, антиексудативну, гемостатичну та репаративну активність. Вперше морфологічно доведена ефективність гелю «Лізостом» при експериментальному гінгівіті та стоматиті. Вперше визначено, що гель «Лізостом» сприяє нормалізації цитокінового профілю. при

експериментальному гінгівіті та стоматиті. Вперше проведені дослідження впливу гелю при експериментальному гінгівіті та стоматиті. Доведена ефективність гелю «Лізостом» у нормалізації кислотно-лужного стану та мобілізації захисних механізмів організму. Доведено позитивний вплив гелю «Лізостом» на синтез нуклеїнових кислот. Наукова новизна роботи підтверджена двома патентами.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі результатів дослідження для клінічних випробувань запропоновано новий стоматологічний гель на основі лізоциму гідрохлориду для лікування стоматитів та гінгівітів з умовною назвою «Лізостом». Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес 5 кафедр фармакології вищих медичних учбових кафедр України.

Повнота викладення матеріалу в опублікованих роботах. За результатами досліджень опубліковано 21 наукову роботу, у тому числі 8 статей, 5 з яких у фахових журналах України, що реферуються міжнародними наукометричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, 3 статті у фахових журналах за кордоном (Республіка Казахстан, Польща), 11 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 2 патенти України: на корисну модель та на винахід. Робота добре апробована.

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту та оформлення. Незважаючи на новизну, практичну значимість, достатній методичний рівень, об'єм досліджень, при роботі з дисертацією та авторефератом виникли деякі зауваження, побажання та запитання, на які б хотілося почути відповідь дисертанта:

1. Доцільно було б у завданнях дослідження розділити визначення ефективної дози, а також гострої токсичності і місцевопідразнювальної властивості.
2. Можливо, краще було б змінити формулювання об'єкта дослідження (порушення ексудативних, репаративних,

морфологічних та інших властивостей слизової оболонки порожнини рота при гінгівіті і стоматиті).

3. Доцільно в аналізі результатів дослідження виділити ступінь лікувальних і профілактичних ефектів гелю «Лізостом» в порівняльному аспекті при гінгівіті і стоматиті.
4. Необхідно конкретизувати деякі висновки і, наприклад, стосовно впливу на показники кислотно-лужної рівноваги.
5. В тексті присутні друкарські помилки.

Незважаючи на повноту викладу матеріалу, до дисертації виникли наступні питання, на які хотілося б почути відповідь дисертанта:

1. Чи є ваші чи літературні дані щодо порівняння антиексудативної, протимікробної, репаративної активності лізоциму у вигляді гелю та розчину або таблеток для розсмоктування?
2. Який механізм реалізації протимікробної дії лізоциму за літературними даними?
3. За літературними даними на які показники метаболізму, крім прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, впливають препарати лізоциму при застосуванні різних лікарських форм при різних шляхах введення?

Встановлені зауваження та питання не є принциповими та не понижують наукову і практичну цінність дисертації.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертація

Кавушевської Н.С. «Фармакологічне дослідження гелю на основі лізоциму для лікування гінгівітів та стоматитів» представляє закінчену роботу, виконана на хорошому методичному рівні з залученням достатньої кількості тварин. Робота має наукову новизну, тому що в ній вперше встановлена антимікробна, антиексудативна, гемостатична та репаративна активність

гелю «Лізостом». Дисертація також має практичне значення, тому що отримані експериментальні результати є фрагментом доклінічних досліджень гелю «Лізостом» з метою отримання дозволу для клінічних досліджень. Таким чином, за актуальністю проблеми, новизною, практичним значенням, ступене опублікування та загальним науковим рівнем робота повністю відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013р. №567(зі змінами), які ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор Кавушевська Наталія Сергіївна заслуговує на присудження ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Професор кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця
доктор медичних наук,
професор

Горчакова
Н.О. Горчакова
12 05 17

