

ВІДЗИВ

офіційного опонента **Гунчака Василя Михайловича** на дисертаційну роботу Горюк Юлії Вікторівни на тему: «Обґрунтування, розробка та застосування бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит», подану на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія

1. Актуальність обраної теми досліджень.

Мастит залишається широко розповсюдженим захворюванням молочного стада в усьому світі, при цьому мікроорганізми є основною причиною виникнення інфекції молочної залози. Найчастіше дана патологія має субклінічний перебіг, і в основному, реєструється у лактаційний період. Збудниками маститу у корів є, як правило, бактерії із родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, у меншій мірі із родів *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*. На даний час основним методом лікування корів з цією патологією є використання антимікробних препаратів, зазвичай антибіотиків. Проте, мастит корів – це рекурентне захворювання, яке досить часто рецидивує і молочне скотарство зазнає значних збитків через недоотримання молока і його вибракування під час антибіотикотерапії. Крім того, переважаючий збудник маститу корів золотистий стафілокок протягом останніх років швидко набуває резистентності до антимікробних препаратів, через це, ще колись досить ефективна терапія антибіотиками стає малоефективною, а тварин необхідно вибраковувати. Науковці у всьому світі шукають альтернативні антибіотикам методи лікування і профілактики даного захворювання. Вказується, що фаготерапія може бути досить перспективним і актуальним методом лікування маститу, яка зможе вирішити декілька завдань одночасно, зокрема зменшити використання антибіотиків у тваринництві і, тим самим, знизити формування резистентних мікроорганізмів у навколишньому середовищі, які є резервуаром генів стійкості для більшості бактерій. Крім того, фаготерапія може зменшити витрати власників тварин за вибракування молока під час лікування маститу.

Отже, альтернативою щодо заміни антибіотиків у лікуванні корів за маститу може бути фаготерапія. Бактеріофаги – це природні віруси, які проявляють високу специфічність до бактерійного хазяїна. Фаг інфікує бактерію, вводячи свій генетичний матеріал через клітинну стінку та мембрану, в результаті чого метаболізм господаря перенаправляється для швидкої реплікації фагів. До завершальної стадії циклу реплікації бактеріофагів ендолізину, кодовані фагом, впливають на клітинну стінку бактерії зсередини, що призводить до вивільнення фагового потомства і знищення патогену.

Ряд вчених висловлюють думку, що з екологічних і фізіологічних причин, бактеріофаги, ймовірно, будуть ефективнішими, ніж антибіотики в знищенні бактерій у біоплівці. Властиво тому, розробка ефективних, екологічно безпечних та економічно вигідних методів і фармакологічних препаратів для лікування корів за розвитку маститу, із застосуванням специфічного бактеріофагу, відносно основного збудника *S. aureus var. bovis*, визначила основний напрям опонованої нами дисертаційної роботи, що робить її актуальною як в теоретичному так і практичному сенсі.

2. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертаційного дослідження, наукова новизна.

Детальне ознайомлення із змістом дисертаційної роботи, рефератом та опублікованими працями, за темою дисертації, дає всі підстави зробити заключення про те, що основні наукові положення, висновки, практичні і науково-методичні рекомендації, які визначають наукову новизну і практичну значимість для виробництва даної роботи, є досить обґрунтованими, сформульовані авторкою самостійно і свідчать про її особистий внесок у розвиток ветеринарної науки. Це підтверджується аналізом і широким використанням нею досягнень вітчизняної науки та положень зарубіжних концепцій. Методологія і методи досліджень, використані здобувачкою, не містять протиріч і повністю відповідають поставленій проблемі.

Дослідження за темою дисертаційної роботи проведено, як в умовах лабораторій так і виробничих цехів підприємств молочної галузі. Докторанткою

проведено значну підготовчу роботу, що дозволило їй обґрунтувати потребу у розробці нового протимікробного засобу. Так, нею в експерименті з'ясовано чутливість виділених культур бактерій до 10 антибіотиків, 25-ти протимаститних внутрішньоцистернальних препаратів, 2-х промислових фагових препаратів українського виробництва тощо. Під час створення нового препарату, в основі якого був фаг *Phage SAvB14*, виділено 17 штамів стафілококових бактерій фагів та досліджено 3-ти варіанти препарату з різними титрами.

Для виконання завдань, поставлених у меті роботи, докторантка використала новітню апаратуру і обладнання, сучасні та класичні методи фармакологічних, токсикологічних, мікробіологічних, біохімічних, гематологічних, морфологічних та статистичних досліджень, які вдало поєднала із проведенням експериментів.

Для доклінічних досліджень і виробничих випробувань авторка використала достатню за видами кількість лабораторних (білі миші, кролі) і продуктивних (корови) тварин, що разом із значним об'ємом експериментів дозволило в повній мірі зреалізувати поставлені задачі, зробити науково-обґрунтовані висновки та запропонувати конкретні пропозиції для виробництва щодо використання створеного нею препарату «Фагомаст».

Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, поданих в опонованій нами дисертаційній роботі, та вірогідність отриманих результатів підтверджується високим методичним рівнем поставлених експериментів, логічністю і послідовністю їх виконання та відповідністю методів досліджень поставленій меті і визначеним завданням та достовірністю отриманих результатів.

Мету і задачі досліджень авторкою сформульовано і аргументовано. Наукова новизна роботи полягала в обґрунтуванні, розробці і впровадженні у виробництво нового бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит. Здобувачкою уперше визначено фармакодинаміку та біотехнологічні підходи щодо препаратів на основі бактеріофагів. Нею розроблено внутрішньоцистернальний препарат «Фагомаст», діючою речовиною якого є фаг

Phage SAvB14 з титром не менше 10^7 БУО/см³, що проявляє високу фармаколітичну активність щодо *S. aureus var. bovis*.

Уперше розроблено методологію виділення та дослідження властивостей штамів бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах. Виділено та досліджено біологічні властивості високолітичного штаму бактеріофагу *Phage SAvB14*. Встановлено, що *Phage SAvB14* проявляє високолітичну активність щодо *S. aureus var. bovis*, утворює прозорі з чіткими краями бляшки розміром 1-2 мм, стійкий до впливу високих температур, хлороформу та коливань рН середовища, має короткий латентний період із формуванням високого титру нових віріонів.

З'ясовано, що DL_{50} Фагомасту становить більше 5000 мг/кг маси тіла тварин. Препарат не володіє кумулятивними, сенсibilізувальними властивостями, не викликає подразнення, нетоксичний за перорального попадання в живий організм та не впливає на зміну морфологічних показників крові лабораторних тварин. Він не спричиняє місцево-подразнювальної дії на слизових оболонках очей кролика. Встановлено, що за концентрації фагів від 10^4 до 10^9 БУО/см³ у препараті, зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не виявлені. За встановленими токсикологічними параметрами препарат віднесено до IV класу (малотоксичні) безпечності.

В експерименті підтверджено, що введення препарату «Фагомаст» здоровим тваринам не впливає на морфологічні та біохімічні показники крові, не спричиняє видимих клініко-патологічних змін. За лікування корів, хворих на мастит, досліджуваний засіб відновлює показники крові до фізіологічних значень упродовж 5-ти діб. Він проявляє кращий синергічний ефект при взаємодії з антибіотиками (гентаміцин) за поетапного застосування.

Терапевтична ефективність застосування Фагомасту при лікуванні корів за субклінічного маститу становила 92,1%, при цьому *S. aureus* через 5 діб після завершення лікування не виділявся, а кількість соматичних клітин знижувалася у 16,8 раза до $250,1 \pm 22,3$ тис./см. Препарат «Фагомаст» не поступається традиційним методам лікування із застосуванням антибіотиків. Водночас, період часу, протягом якого відбувається вибракування молока, за лікування корів з

маститом Фагомастом, у середньому в 1,5 рази ($p < 0,05$) менший, ніж за лікування препаратами зі вмістом антибіотиків.

3. Вірогідність наукових положень. Отримані результати експериментальних досліджень є вірогідними і не викликають сумнівів. Цифрові дані опрацьовано методами статистичного аналізу, що знайшло своє відображення в обширному розділі дисертаційної роботи «Аналіз і обговорення...».

4. Повнота викладених матеріалів досліджень в опублікованих працях. Основні результати дисертації опубліковано у 37 наукових праць, з них 16 у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України, 7 статей у періодичних виданнях, включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України, або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, 2 деклараційних патенти України на корисну модель, 9 тез конференцій, 2 методичні рекомендації, 1 Технічні умови України. Робота пройшла широку апробацію через участь здобувачки у міжнародних науково-практичних конференціях, з'їздах, форумах тощо. Вимоги щодо опублікування матеріалів наукових досліджень (щодо кількості і відповідності категорії видань) для докторських дисертаційних робіт авторкою виконано повністю. При цьому, підтверджуємо, що наукові праці, які розкривають результати проведеного дослідження не містять академічного плагіату, фабрикації та фальсифікації.

5. Зміст та завершення дисертаційного дослідження. Дисертаційна робота Горюк Ю.В. подана на 366 сторінках комп'ютерного тексту. Вона ілюстрована 56 таблицями та 27 рисунками. Робота підготовлена за вимогами МОН України і складається з анотації, списку наукових публікацій здобувачки, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, власних досліджень, аналізу та узагальнення власних досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаної літератури і додатків.

У вступі (стр. 27-36) обґрунтовано актуальність теми роботи. За проведеного моніторингу захворюваності корів на мастит в Україні, аналізу схем

їх лікування та з урахуванням даних літератури у цьому розділі дисертаційної роботи здобувачкою переконливо доведено потребу у створенні препаратів на основі бактеріофагів, що дозволить мінімізувати застосування антибіотиків в терапії корів за маститу. Тут чітко описано наукову новизну і практичну значимість отриманих результатів, подано інформацію щодо опублікування матеріалів дисертаційної роботи та її широкої апробації. Описано зв'язок роботи з науковими планами, програмами тощо.

У першому розділі «Огляд літератури» (с.36-86) докторантка наводить сучасні дані щодо ризиків, які виникають за лікування корів з використанням хіміотерапевтичних засобів, роблячи особливий наголос на особливостях фармакотерапії за маститу у корів, етіологічним чинником яких є золотистий стафілокок. У цьому розділі дисертаційної роботи авторка цілком логічно описує альтернативні антибіотикам методи фармакотерапевтичного впливу на організм хворих тварин. Так, на її думку, не можна відкидати, а навпаки необхідно поглиблювати теоретичні знання та практичні навички щодо лікування корів, хворих на мастит з використанням пробіотичних препаратів, ефірних олій і препаратів на їх основі. На основі аналізу даних літератури подано характеристику, особливості застосування та, що дуже важливо, позитивні і негативні ефекти за примінення у практичній ветеринарній медицині вакцин, імуностимуляторів та антимікробних пептидів для профілактики маститу у корів. Описано, що в якості антимаститних засобів на даний час застосовують і наночастинки окремих біометалів, йодовмісні антисептичні засоби, прополіс, хінозан тощо.

Значну за обсягом частину цього розділу присвячено аналізу даних літератури щодо фармакотерапевтичного потенціалу бактеріофагів при боротьбі з маститом у корів, їх фармакокінетиці і фармакодинаміці та основним вимогам за розробки препаратів на основі бактеріофагів.

Загалом цей розділ дисертаційної роботи є досить об'ємним, написаний кваліфіковано і відображає вміння авторки критично аналізувати дані літератури та робити з них об'єктивні висновки. За обсягом він не перевищує встановлений

вимогами обсяг (18,8% від основної частини роботи). Аналіз наведеного огляду літератури свідчить, що дисертантка опрацювала значний масив літератури (за її даними кількість джерел латиницею становить понад 95%), на підставі чого логічно їх узагальнила та обґрунтувала потребу у розробці бактеріофагового препарату, як альтернативу антибіотикам.

Другий розділ «Вибір напрямів досліджень». Матеріали та методи досліджень, використані в процесі реалізації плану, викладені на 16 сторінках (стр. 86-102) та відповідають меті і завданням дослідження. Власні експериментальні дослідження здобувачкою проведено поетапно, відповідно до плану та розробленої нею загальної схеми. Тут авторка перераховує об'єкти своїх досліджень, послідовність і схеми окремих дослідів, використовувані методи і методики, що підтверджує повноту і об'єм проведених нею досліджень. Для кращого сприйняття викладеного в розділі матеріалу на рисунку 2.1 відображено схеми дослідів за етапами, що дає можливість побачити цілісність і взаємозв'язок проведених досліджень, виконаних на належному науково-методичному рівні.

В роботі виконано сучасні методи досліджень, проведені впродовж 2017-2022 рр., а саме епізоотологічні, фармакологічні, токсикологічні, морфологічні. Особливий наголос авторка зробила на проведенні чисельних мікробіологічних досліджень, проведених з використанням новітніх методів і методичних прийомів. Для обробки результатів експериментальних даних нею було обрано адекватні методи статистичного аналізу.

Розділ 3. «Результати власних досліджень» є найбільш обширним розділом (стр.102-228). За своєю структурою він містить 4 підрозділи, а кожен із них, у свою чергу, має від 3 до 9 ще окремих підрозділи. У першому підрозділі 3.1, авторка за результатами своїх досліджень аналізує поширеність основних збудників маститу в корів, в тому числі золотистого стафілокока, на молочно-товарних фермах господарств, обраних нею для виконання роботи. При цьому, піддає глибокому аналізу застосування, в кожному конкретному випадку, окремих антибіотиків та чутливість до них виділеної мікрофлори.

Важливим елементом дослідження було з'ясування впливу антибіотиків і досліджуваних внутрішньоцистернальних препаратів на плівкоутворювальні бактерії, які часто слугували основною причиною маститів у корів. Докторантка дослідила метицилінрезистентність та біологічні властивості стафілококів (господарів літичних бактеріофагів) та визначила мінімальну бактерицидну концентрацію антибіотиків щодо *S. aureus*, які перебувають у планктонній та біоплівкових формах.

Стосовно підрозділу 3.2 необхідно відзначити наступне: він був присвячений експериментальному обґрунтуванню вибору діючої речовини для створення препарату на основі бактеріофагу. З цієї метою авторка вивчає передумови і підбір відповідних методик для створення протимаститного препарату, специфічного щодо *S. aureus*. Вивчає вплив бактеріофагів різного біологічного походження на виділені культури цього специфічного збудника. На основі непростих мікробіологічних прийомів виділяє з культури мікробних клітин специфічні бактеріофаги та вивчає їх фармаколітичну активність, залежно від кількості чутливих клітин та фізико-хімічних чинників. Крім того, нею з'ясовано в експерименті антимікробну дію бактеріофагу *Phage SAvB14* на біоплівки, сформовані *S. aureus var. bovis* окремо і в комплексі з антибіотиками.

Підрозділ 3.3. Присвячений доклінічним дослідженням новоствореного препарату «Фагомаст» на токсичність. Авторка своїми дослідженнями на цьому етапі вирішує питання щодо з'ясування безпечності новоствореного протимікробного біозасобу. В дослідях на лабораторних тваринах (білі миші, кролі) вона вивчає параметри токсичності, здатність, за попадання препарату на шкіру і слизові оболонки, викликати шкірно-резорбтивну реакцію, діяти сенсibiliзуючально тощо. За результати своїх досліджень, отриманих в експерименті, в тому числі і з інфузоріями, робить обґрунтований висновок, що створений нею бактеріофаговий препарат є безпечним в токсикологічному відношенні і може бути використаний для клінічних випробувань на тваринах.

У черговому (3.4) підрозділі в умовах виробничого випробування визначається ефективність препарату «Фагомаст» у корів за лікування і

профілактики у них маститу. При цьому ведеться порівняльна оцінка ефективності новоствореного препарату з існуючими протимаститними засобами. З'ясовано, що фармакологічна активність бактеріофагу, який є в основі досліджуваного препарату, є дозозалежною. Вміст діючої речовини визначає ефективність бактеріофагового засобу. Встановлено, що застосування «Фагомасту» коровам із маститом сприяє швидшому виздоровленню тварин, порівняно з іншими протимікробними засобами. З'ясовано, що новостворений засіб за його використання з лікувальною метою, в оптимальних концентраціях, немає негативного впливу на морфологічний і біохімічний склад крові. При цьому, відзначено тенденцію до позитивного впливу препарату на природню резистентність організму корів. Як підсумок цього розділу, авторка, за результатом економічних розрахунків, робить висновок, що лікування корів з маститом, за використання «Фагомасту», становить 456,6 грн на голову.

Експериментальну частину роботи завершує аналіз та узагальнення результатів досліджень (4 розділ, стр. 228-265), в якому в стислій формі відображено суть роботи а за результатами, отриманими в ході її виконання, сформульовано власну гіпотезу. Чітко прослідковується розуміння того, що дисертантка добре ознайомлена з результатами досліджень інших науковців, досконало знає досліджувану проблему, на достатньо фаховому та науковому рівнях аналізує, інтерпретує та порівнює отримані нею результати з даними наукової літератури.

Висновки сформульовані в дисертаційній роботі є логічним продовженням її основних положень та лаконічною суттю отриманих результатів і дають повну та вичерпну відповідь на поставлені завдання досліджень. Вони викладені в 15 пунктах і відображають фактичний матеріал результатів проведених досліджень, містять чіткі відповіді на завдання, поставлені на початку роботи, є взаємодоповнюючими та дозволяють скласти цілісне уявлення про дану наукову працю.

Пропозиції виробництву складаються із 4-х конкретних пунктів і характеризують практичну значимість даної роботи та стануть вагомою підмогою для практикуючих лікарів ветеринарної медицини за лікування корів із маститом.

Список використаних джерел літератури складений відповідно до вимог, з урахуванням національного стандарту України ДСТУ 8302:2015. Він включає 591 джерело, з яких 27 кирилицею та 564 латинським шрифтом.

Реферат за змістом і суттю є коротким відображенням дисертаційної роботи та відповідає вимогам, визначеними спеціалізованою вченою радою. Оцінюючи позитивно ці розділи дисертаційної роботи хотілося б виразити своє бачення окремих положень, наведених в ній та отримати відповіді на запитання, що виникли в процесі рецензування роботи, зокрема:

- На сьогодні вже немає жодного сумніву в тому, що причиною маститу в корів є не тільки золотистий стафілокок, але й інші мікроорганізми. Чим аргументований Ваш вибір і розробка бактеріофагів, чутливих, виключно до *Staphylococcus aureus*?
- В чому, на Вашу думку, полягає механізм протимікробної дії «Фагомасту»?
- Цікаво дізнатися чи є на ринку України комерційні препарати бактеріофагів з вибірковою протимікробною дією щодо золотистого стафілокока. Якщо є, то які? Порівняйте їх із Вашим пропонованим препаратом.
- Поясніть, будьте добрі, які чинники впливають на ефективність фаготерапії. Ви вживаєте термін «раціональна фаготерапія». Що розумієте під ним?
- Охарактеризуйте, будь ласка, фізико-хімічні властивості біопрепарату «Фагомаст» (колір, рН, термін зберігання, стабільність, чутливість до $t^{\circ}\text{C}$, світла і т.д.). Опишіть особливості технології виготовлення цього біопрепарату.
- В роботі часто зустрічається вислів: «автохтонна мікробіота шкіри дійок вимені». Розшифруйте, якщо можете, його суть.
- Уточніть, будь ласка, за якої форми перебігу маститу ефективний Фагомаст: за перебігу з характерною клінікою чи за скритої форми? Обґрунтуйте?
- Не піддаючи жодному сумніву в тому, що лікування корів з маститом, за використання Фагомасту, є перспективним напрямком у ветеринарній практиці,

хотілося б почути від Вас відповідь на запитання: Чи можна бактеріофагові препарати використовувати за метафілактики маститу у корів?

– Про лікувальну ефективність Фагомасту у корів з маститом ми почули, а як з економічною складовою?

Крім того, відзначаємо, що в роботі інколи зустрічаються невдалі або некоректні вирази, наприклад: «обробка Фагомастом»; не LD_{50} а DL_{50} ; не вага а маса тіла мишей; не сенсibilізуюча і подразнююча а сенсibilізувальна і подразнювальна; не лікування маститу в корів, а лікування корів з маститом, не у I-ій дослідній групі мишей, а у мишей I-ої дослідної групи тощо.

По тексті роботи (стр. 132, 195, 211, 213, 250) наявні окремі граматичні помилки, що носять механічний характер. Однак, зроблені зауваження не є принциповими, частина з них має уточнюючий та дискусійний характер. Вони, як і задані запитання, лише підкреслюють значимість цієї роботи, її високий методичний рівень та значення для практики ветеринарної медицини.

Загальний висновок. Аналіз дисертації, реферату, і наукових праць, опублікованих за темою дисертації, дозволяє зробити висновок, що Ю.В. Горюк виконала актуальну наукову працю, яка має певне теоретичне і практичне значення. Робота Ю.В. Горюк – самостійна наукова праця. Авторкою отримано нові наукові дані щодо можливості застосування створеного нею препарату «Фагомаст», на основі бактеріофагу, для лікування корів за стафілококового маститу. Важливо відзначити, що пропонується нею новий фармакологічний засіб є не лише препаратом, що ефективно знешкоджує патогенну чи умовно патогенну мікрофлору, він є реально альтернативою для широкого застосування антибіотиків у ветеринарній практиці. «Фагомаст» попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, виключає або суттєво зменшує поступлення залишкових кількостей антибіотиків у молоко, що дозволяє одержувати екологічно безпечний продукт.

Окремі теоретичні положення дисертаційної роботи, зокрема стосовно препарату «Фагомаст» (характеристика, дози, механізм дії, фармакодинаміка і

фармакокінетика) можуть бути введені до навчальної і робочих програм із курсу «Ветеринарна фармакологія», зокрема розділу «Протимікробні засоби».

Вважаю, що дисертаційна робота на тему: «Обґрунтування, розробка та застосування бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит» за актуальністю, обсягом проведених досліджень, високим науково-методичним рівнем виконання, науковою новизною та практичним значенням результатів дослідження а також за оформленням відповідає вимогам п.п. 7 і 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 року № 1197, а дисертантка Горюк Юлія Вікторівна заслуговує на присудження її наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія.

Офіційний опонент, зав. кафедри фармакології та токсикології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, д.вет.н., член-кор. НААН, професор



[Handwritten signature]

В.М. Гунчак

27.03.2023 р.

Підпис проф. Гунчака В.М. засвідчую

начальник відділу кадрів



ВІРНО
НАЧАЛЬНИК ВІДДІЛУ КАДРІВ
Львівського
НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ
імені С.З.Гжицького

[Handwritten signature]

О.П. Гентош

Львівський НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ім. С.З.Гжицького	
№	21-39
30	03 2023 р.
м. Львів, вул. Пекарська, 50	