

ВІДГУК

офіційного опонента доктора ветеринарних наук, професора
КОВАЛЕНКА Вячеслава Леонідовича на дисертаційну роботу

КОЖИНА Владислава Анатолійовича на тему:

**«Теоретичне обґрунтування розробки дезінфікуючого
засобу з вмістом ензимів активного щодо бактерій у біоплівках та
органічного забруднення»**, представленої на здобуття освітньо-наукового ступеня
доктора філософії, в галузі знань 21 «Ветеринарія», за спеціальністю 211
«Ветеринарна медицина» у Львівський національний університет ветеринарної
медицини і біотехнологій імені С. З. Гжицького

Актуальність теми дисертації та її зв'язок з науковими програмами, темами. Сучасні біоцидні засоби, для дезінфекції, містять у своєму складі такі діючі хімічні речовини, як спирти, альдегіди, аніліди, бігуаніди, біс-феноли, діамідини, галоген-вивільняючі агенти, галофеноли, кислоти, похідні важких металів, пероксиди, феноли та крезолі, четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), хлор-вивільняючі агенти та озон. Проте мікробні популяції по-різному реагують на кожен хімічний сполук, зокрема можуть захищатися від антибактеріальних речовин завдяки здатності продукувати ензими, які знищують біоциди, завдяки зміні проникності клітинної стінки і цитоплазматичної мембрани для запобігання потраплянню біоциду всередину. Також один із біологічних механізмів захисту мікробних клітин від дії біоцидів – це їх здатність формувати біоплівки.

Тому науковці при створенні дезінфікуючих засобів використовують та поєднують між собою хімічні субстанції із різних груп, дія яких направлена на пригнічення активності різних ферментних систем бактеріальної клітини, руйнування її структурних елементів та деградації біоплівки.

Отже, розробка дезінфікуючих засобів, які володіють широким спектром антимікробної дії, при цьому впливають на біоплівкові форми мікроорганізмів та активні за наявності в середовищі органічних речовин є актуальним і перспективним.

Тому дисертаційна робота Владислава Кожина спрямована на обґрунтування та розробку дезінфікуючого засобу на основі ЧАС, похідних біогуанідину та протеолітичних і гліколітичних ензимів активних щодо бактерій у біоплівках та органічного забруднення для застосування у клініках ветеринарної медицини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в Подільському державному аграрно-технічному університеті (нині Заклад вищої освіти «Подільський державний університет») на кафедрі інфекційних та інвазійних хвороб та кафедрі ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії за ініціативною тематикою «Розробка нових антимікробних препаратів і засобів для профілактики і лікування хвороб тварин та дезінфекції у ветеринарній медицині», номер державної реєстрації 0122U200511.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше науково обґрунтовано розробку нового дезінфікуючого засобу для дезінфекції, достерилізаційного

очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини шляхом поєднання хімічних субстанцій із класу ЧАС, похідних біогуанідину, протеолітичних та гліколітичних ензимів. Встановлено, що деззасіб «Ензидез» активний щодо біоплівкових форм бактерій та за можливого органічного навантаження. Дезінфектант проявляє бактерицидну активність щодо музейних штамів бактерій *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* і грибів роду *Candida spp.* починаючи з 0,1 % концентрації та експозиції 15 хв, добре проникає в капілярну систему будівельних матеріалів (кахель), слабокорозійний відносно оцинкованої і нержавіючої сталі, проявляє мийні властивості та протеолітичну активність. На підставі лабораторних токсикологічних досліджень встановлено, що деззасіб «Ензидез» є безпечний, не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії, не викликає видимих змін слизової оболонки очей кроликів та фізіологічних змін показників крові мишей.

Розроблено режими застосування дезінфектанту в клініках ветеринарної медицини для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) та усіх видів виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення, визначено його ефективні концентрації.

Наукова новизна розробки підтверджена деклараційним патентом на корисну модель «Спосіб дезінфекції обладнання, інструментів, об'єктів ветеринарного нагляду у ветеринарній медицині», № 150859 від 05.05.2022 р., Бюл. № 18.

Практичне і теоретичне значення одержаних результатів. На підставі проведених лабораторних (мікробіологічних, фізико-хімічних, токсикологічних) та клінічних досліджень встановлено, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» ефективний за дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів, виробів, інструментів та обладнання у клініках ветеринарної медицини.

Отримані результати щодо бактерицидної та протигрибкової дії дозволяють використовувати його для руйнування біоплівкових форм бактерій навіть за органічного забруднення, що відображено у методичних рекомендаціях «Застосування дезінфікуючого засобу «Ензидез», які затверджено на засіданні науково-методичної ради ЗВО «ПДУ», протокол №8 від 22 листопада 2022 року.

На підставі результатів досліджень запропоновано ТУ У 21.2–22769675–002:2022) на розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез».

Ступінь обґрунтованості та достовірності досліджень. Проаналізувавши матеріал дисертації, необхідно відмітити наступне: наукові положення, висновки та рекомендації дисертації обґрунтовані й узагальнені, впливають з результатів досліджень. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, що включає 221 джерело, з яких 133 – латиницею та 5 додатків. Дисертацію викладено на 178 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 25 таблицями, 19 рисунками.

У розділі 1 «Огляд літератури» відображено науковий пошук дисертанта, автор на основі опрацьованих ним джерел літератури виклав науковий матеріал, щодо інформації про ринок дезінфікуючих засобів в Україні та чинники, які впливають на активність дезінфікуючих засобів у виробничих умовах. Також наведено дані про Ензими, як складові компоненти біоцидних засобів для

деградації мікробних біоплівок. Автором окреслено дискусійні питання, або такі, що не знайшли достатнього висвітлення в сучасних наукових джерелах та які потребують вирішення.

Розділ 2 «Вибір напрямків досліджень. Матеріали і методи досліджень».

Дисертаційна робота виконувалася на кафедрі інфекційних та інвазійних хвороб та кафедрі ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (м. Кам'янець-Подільський) протягом 2019 – 2022 років. Виробничі дослідження проводили у приватних клініках ветеринарної медицини м. Кам'янець-Подільський (ветеринарна клініка «VitaeVet»), м. Чернівці (ветеринарна клініка «Пан Коцький» та «VetLife») та м. Чортків (ветеринарна клініка «ZooVetSkill»).

Основним напрямком роботи було експериментально обґрунтувати та розробити дезінфікуючий засіб на основі ЧАС, похідних біогуанідину та протеолітичних і гліколітичних ензимів, активного щодо бактерій у біоплівках за органічного забруднення, для застосування у клініках ветеринарної медицини. У даному розділі наведено загальну схему проведення досліджень, здобувач розділив виконання роботи на п'ять етапів, у яких детально наведено застосовані методи й способи, які використовувалися при розробці дезінфікуючого засобу.

Варто вказати, що комплексне використання застосованих методів підвищило цінність отриманих результатів, вивело їх на новий доказовий рівень. Здобувач навів методи статистичного аналізу.

Розділ 3 «Результати власних досліджень». Даний розділ здобувачем розділено на вісім повноцінних підрозділів і становить 67 сторінок.

У підрозділі 3.1 «Підбір дезінфікуючих субстанцій для створення дезінфікуючого засобу з мийним ефектом для застосування у клініках ветеринарної медицини та інших об'єктів ветеринарного нагляду», виявлено, що поєднання антибактеріальної речовини з ензимами є доброю перспективою у боротьбі з бактеріями у біоплівках на поверхнях різних матеріалів. При виборі дезінфікуючого засобу необхідно оцінити ефективність його до бактерій у біоплівках за умов, близьких до виробничих.

У підрозділі 3.2 «Розробка регламенту виробництва комплексного дезінфектанту «Ензидез» наведено схему технології виготовлення дезінфікуючого засобу «Ензидез».

У підрозділі 3.3 «Дослідження бактерицидних властивостей дезінфікуючого засобу «Ензидез»», встановлено, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» досить високоактивний навіть за наявності у середовищі білка. Це пояснюється наявністю у складі засобу протеолітичних ензимів, які розкладають білки і тим самим сприяють кращому контакту дезінфікуючої субстанції з мікробними клітинами.

У підрозділі 3.4 «Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-об'єкти, контаміновані мікроорганізмами», виявлено, що розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез» проявляє добру дезінфікуючу активність на поверхні і вглибині тест-об'єктів, щодо умовно-патогенних, спороутворюючих бактерій та грибової мікрофлори за 0,1 % концентрації та часу дії не менше 15 хв.

У підрозділі 3.5 «Активність дезінфікуючого засобу «Ензидез» щодо бактерій у біоплівках», показано, що ефективний, оптимальний час дії

дезінфікуючого засобу «Ензидез» на біоплівки, сформовані *S. aureus*, *E. coli* і *P. Aeruginosa*, становить 15 – 30 хв.

У підрозділі 3.6 «Оцінка дезінфікуючого засобу «Ензидез» за фізико-хімічними показниками» виявила, що розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез» за концентрації розчинів 0,5 – 1,0 % забезпечував добру змочувальну здатність, мийні властивості на оцінку добре і відмінно, а піноутворювальна здатність та стійкість піни є цілком прийнятна з метою застосування для дезінфекції обладнання, інструментів, об'єктів ветеринарного нагляду. За корозійною активністю щодо оцинкованої і нержавіючої сталі «Ензидез» вважається слабо корозійноактивним та може застосовуватися протягом тривалого часу щодо даних видів сталі.

У підрозділі 3.7 «Токсикологічні дослідження дезінфікуючого засобу «Ензидез»» виявили, що 1 % розчин деззасобу «Ензидез» належить до малотоксичних речовин (LD_{50} більша 5000 мг/кг маси тіла – 4 клас), не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії, не викликає видимих змін слизової оболонки очей кроликів, концентрований засіб має слабо виражену кумулятивну дію (коефіцієнт 1,4 од). Морфологічні дослідження периферичної крові та біохімічні сироватки мишей за внутрішньошлункового введення робочої концентрації розчину дезінфектанту через 12 діб спостереження не виявили значних змін, які б виходили за фізіологічні величини.

У підрозділі 3.8 «Дослідження впливу деззасобу «Ензидез» під час до стерилізаційного очищення хірургічних інструментів та виробів ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини» встановили, що дезінфектант «Ензидез» можна застосовувати для дезінфекції кахельних стін і столів у 0,25 % концентрації, а для повного знищення мікроорганізмів на підлозі у 0,25 – 0,5 % концентрації протягом 15 хв експозиції. Для проведення до стерилізаційного очищення та стерилізації інструментів, обладнання чи виробів ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини використовувати 0,25 % розчин Ензидезу за температури від + 20 до + 60°C і експозиції 15 хв.

У розділі 4 «Аналізу і узагальнення результатів досліджень» дисертант узагальнює одержані результати експериментальних досліджень і аргументує отримані ним результати, порівнюючи їх з результатами досліджень інших науковців.

Дев'ять висновків повністю відповідають поставленим меті та завданням і узагальнюють інформацію, отриману автором при проведенні досліджень.

Пропозиції виробництву конкретні та можуть бути використаними лікарями ветеринарної медицини в практичній роботі.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дисертації опубліковано 7 друкованих наукових праць, із них 6 статей у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у закордонному виданні, яке входить у науково-метричну базу Scopus, 4 праці – у матеріалах конференцій, отримано деклараційний патент на корисну модель, розроблено і затверджено технічні умови України на дезінфікуючий засіб «Ензидез» та методичні рекомендації.

Основні результати досліджень доповідались, обговорювались та отримали схвалення на засіданнях науково-технічної ради Подільського державного

аграрно-технічного університету та на конференціях і семінарах: I Міжнародній науково-технічній конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (Тернопіль, 2021); щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2021; 2022); II конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині», присвяченій 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клініко-стаціонаром для тварин у Львові» (Львів, 2021).

Під час ознайомлення з текстом дисертації порушень академічної доброчесності не виявлено. Використання текстових запозичень без відповідних посилань на інформаційні джерела не зафіксовано.

Отже, дисертаційна робота Кожина Владислава Анатолійовича є завершеною науковою працею, що містить усі необхідні розділи.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації. Оцінюючи позитивно дисертаційну роботу Владислава Кожина вважаємо за необхідне висловити деякі зауваження та дискусійні питання:

- Скажіть будь ласка за якою методикою Ви визначали білковий і фенольний індекс розробленого дезінфікуючого засобу «Ензидез»?

- Який механізм дії на мікроорганізми Вашого дезінфікуючого засобу «Ензидез»?

- Хотілося б почути від автора, що таке моно і змішана мікробна біоплівка?

- На думку опонента у висловлюванні автора «...у клініках ветеринарної медицини шляхом поєднання дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС, похідних біогuanідину...» замінити слово «дезінфікуючих» на «хімічних або діючих речовин» та по тексту роботи.

- Скажіть будь ласка яка мікрофлора найчастіше циркулює у клініках ветеринарної медицини, а особливо у тих де Ви проводили дослідження?

- На думку опонента автором наведено не вдало назву підрозділу «Дослідження активності дезінфікуючих біоцидів та ензимів протеаз і амілаз на бактерії у біоплівках», можна було без слова «дезінфікуючих».

- Хотілося б почути від автора, які дезінфікуючі засоби використовують у клініках ветеринарної медицини, де Ви проводили дослідження?

- Проводячи дослідження у клініках ветеринарної медицини скажіть будь ласка чи проводять там моніторинг ефективності наявних дезінфікуючих засобів?

- Згідно Ваших досліджень, яка концентрація є ефективною щодо знищення мікробної біоплівки при дезінфекції столів та різних інструментів?

- Чому самі ці групи ензимів Ви пропонуєте застосовувати у деззасобі «Ензидез»?

- Яка відмінність Вашого дезінфікуючого засобу «Ензидез» від аналогічних біоцидних засобів, що застосовуються на ринку ветеринарних препаратів?

- Як Ви визначали протеолітичну активність свого деззасобу?

- По тексту зустрічаються різні назви засобу «Ензидез»: дезінфікуючий, біоцидний, дезінфектант, деззасіб чи є яка різниця між ними?

Наявні окремі помилки у тексті дисертації, не є принциповими і не зменшують наукової цінності та актуальності проведених досліджень, особливо, практичну значимість даної дисертаційної роботи.

Аналіз матеріалів дисертації дав можливість зробити загальний висновок, що дисертант за вибором теми, методичним рівнем, аналізом літературних джерел і результатів досліджень, висновків та практичних рекомендацій проявив себе кваліфікованим, ерудованим науковцем, який може ставити перед собою наукові проблеми та самостійно їх вирішувати.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації в практиці.
Отримані результати матимуть практичне значення для проведення дезінфекції та до стерилізаційного очищення у клініках ветеринарної медицини. Отримані дані можуть бути використані при написанні монографій, навчальних посібників з дезінфекції об'єктів ветеринарного нагляду.

Загальний висновок.

Враховуючи актуальність теми, її наукову новизну, обсяг досліджень та їх високий методичний рівень, теоретичну й практичну цінність і всебічний аналіз одержаних результатів, їх апробацію та висвітлення, зміст висновків і пропозицій, відповідність спеціальності 211 – Ветеринарна медицина вважаю, що дисертаційну роботу Кожина Владислава Анатолійовича на тему: *«Теоретичне обґрунтування розробки дезінфікуючого гозасобу з вмістом ензимів активного щодо бактерій у біоплівках та органічного забруднення»*, необхідно визнати завершеним науковим дослідженням. Дисертація відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», постанови Кабінету Міністрів України № 261 від 23 березня 2016 року «Про затвердження Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», а її автор – Кожин Владислав Анатолійович заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 21 «Ветеринарна медицина» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина».

Офіційний опонент:

головний науковий співробітник
науково-дослідного вірусологічного
відділу ДНДІЛДВСЕ,
доктор ветеринарних наук, професор



В. Л. КОВАЛЕНКО

Підпис док. вет. наук, професора Коваленка В. Л. засвідчую

Заступник директора Державного НДІ з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи _____ Н. В. КУРЯТА

05 лютого 2024 року

