

## ВІДГУК

**офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри мікробіології, вірусології, епідеміології з курсом інфекційних хвороб медичного факультету Ужгородського національного університету МОН України Коваль Галини Миколаївни**

**на дисертаційну роботу Букіної Юлії Вячеславівни на тему «Сальмонела-індуковані зміни кишкового мікробіому і транскрипції генів *FFAR 2*, *Foxp 3* і *RORγt* імунної відповіді», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія**

**Актуальність теми дисертації.** Однією з найбільш проблемних нозологічних форм у структурі групи гострих кишкових інфекцій є сальмонельоз. Епідеміологічна значимість цього захворювання визначається насамперед можливістю реалізації шляхів передачі інфекції з їжею при недотриманні санітарних вимог до виробництва, транспортування, зберігання продуктів та приготування готових страв. Розповсюдження захворюваності на сальмонельоз у багатьох країнах світу, збільшення числа серологічних варіантів збудників, контамінація сальмонелами об'єктів зовнішнього середовища, особливо харчових продуктів тваринного походження, визначають проблему сальмонельозу як надважливу серед сучасних медико-соціальних проблем.

Для України теж актуальною залишається проблема гострих кишкових інфекцій, а саме сальмонельоз, рівень захворюваності яким у ряді міст і областей країни зберігає тенденцію до зростання. По регіонах України питома частка захворювань, спричинених сумарно цими сероварами, *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* коливалася від 46,2 % у Запорізькій області до 100 % у Чернівецькій.

Вищевикладене підтверджує перспективність та актуальність наряду дослідження Букіної Ю.В. Завдяки активним дослідженням, в дисертаційній роботі показано, що сальмонели, КЛЖК і прийом антибіотиків індукують формування НПП та пригнічують запалення в кишечнику. Тому вивчення процесів взаємодії *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* з представниками нормальної мікрофлори кишечника в умовах введення ванкоміцину і *Bacteroides fragilis* має медичну й соціальну значущість, а їх розкриття та поглиблене дослідження залишаються досі актуальними.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами:** Актуальність теми також підтверджується виконаним комплексом досліджень в

рамках науково-дослідних робіт на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету. Представлені дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Молекулярно-генетичний аналіз змін транскриптому генів імунної відповіді і кишкового мікробіому в умовах експериментальної патології та розробка методів їх корекції» (2018-2022 рр., № держреєстрації 0118U007141), що відповідають пріоритетним напрямкам розвитку фундаментальної і прикладної медичної науки і спрямовані на вирішення актуальних проблем охорони здоров'я в Україні.

**Наукова новизна та теоретичне значення дослідження.** Оцінюючи найважливіші здобутки дисертаційного дослідження, варто вказати на наступні результати, що мають вагому наукову новизну – це експериментальна частина роботи дисертанта. За допомогою бактеріологічного, молекулярно-генетичного, хромато-мас-спектрометричного та імунофлюоресцентного методів аналізу виявлено комплекс змін у складі кишкового мікробіому. Уперше встановлено відмінність видових та кількісних показників мікробіоценозу кишечника у щурів за умов норми або розвитку сальмонела-індукованого запалення. Доведено, що в умовах СІЗК відбуваються зміни ключових імунорегуляторних бактерій.

При моделюванні експериментальної патології вперше встановлено, що введення *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* на тлі передоброби ванкоміцином спричиняє зміну рівня експресії мРНК генів *FFAR 2*, *Foxp 3*, *Roryt*, ефекторних білків сальмонел *Sip A*, *Sop B*, *SopE 2*, концентрацію коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) та стимулює утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у щурів при сальмонела-індукованому запаленні кишечника.

**Практичне значення результатів дослідження.** Робота має безсумнівний практичний вихід, який ґрунтується на розробці нових науково обґрунтованих підходів для конструювання медичних баз даних з моніторингу поширення антибіотикорезистентних штамів *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* при розвитку СІЗК в Україні, а також для відстеження й аналізу змін біологічних властивостей цих штамів.

Отримані дані Букіною Ю. В. дозволяють рекомендувати використання культур *B. fragilis* у якості можливої ад'ювантної терапії у поєднанні з антибактеріальними препаратами у схемі лікування СІЗК.

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, були впроваджені в практичну діяльність лабораторії загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», «Інститут мікробіології та імунології

ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (акт впровадження від 10.01.20), кафедри військової терапії Дніпропетровської

військово-медичної академії (акт впровадження від 15.01.20), в навчальний процес кафедр мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології (акт впровадження від 05.12.19) та інфекційних хвороб (акт впровадження від 20.01.20) Дніпропетровської медичної академії, кафедри мікробіології, вірусології та імунології (акт впровадження від 21.01.20) Харківського національного медичного університету; кафедр дитячих інфекційних хвороб (акт впровадження від 10.01.20) та інфекційних хвороб (акт впровадження від 10.01.20) Запорізького державного медичного університету.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій** підтверджуються комплексним підходом до вирішення поставлених задач, репрезентативною кількістю мікробіологічних методів досліджень, статистичною обробкою отриманих результатів. Обрані автором сучасні та інформативні методи досліджень дозволили повністю виконати поставлені задачі, які сформульовано відповідно меті досліджень. Завдяки комплексному підходу до вирішення поставленої у роботі мети, автором повністю розкрито суть проблеми, що вивчалась, а також обґрунтовано практичні рекомендації.

Дисертаційна робота відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д **64.618.01** ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальності 03.00.07 – мікробіологія.

За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць (4 – моно), з них 7 статей (4 – у наукових фахових виданнях України, 7 — включені до міжнародних наукометричних баз, 3 – Scopus і Web of Science), 1 патент на корисну модель, 10 тез у матеріалах наукових конференцій та форумах. Зміст автореферату відображає основні положення дисертації.

**Послідовність викладу і оцінка змісту дисертації.** Дисертація складається зі вступу, розділу огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних літературних джерел із 383 найменувань, з яких 10 написано кирилицею, 373 латиницею. Робота викладена на 246 сторінках, ілюстрована 38 рисунками, 17 таблицями, які займають 13 сторінок.

У вступі чітко обґрунтовано актуальність проблеми, науково коректно сформульовано мету, яка корелює з темою та конкретизується у завданнях, встановлено об'єкт та предмет роботи. Логічно окреслено систему використаних в роботі дослідницьких методів.

Перший розділ дисертації представлено у вигляді огляду літератури, який подано як аналіз основних наукових публікацій за темою дисертаційної роботи з використанням вітчизняних і іноземних джерел, переважно останніх 5-7 років. Загальний обсяг огляду літератури відповідає діючим вимогам.

В другому розділі описані методи і об'єкт дослідження. Достатня кількість проведених досліджень дозволила провести достовірну оцінку отриманих результатів та водночас вказує на правильні методичні підходи, що використовувались при виконанні дослідження. Автором ґрунтовно описані всі методи використанні в роботі.

Власні дослідження, описані у третьому розділі, присвячені визначенню кількісного складу мікроорганізмів у пристінковому вмісті тонкого кишечника у щурів при введенні ванкоміцину та *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium*. За результатами проведених бактеріологічних досліджень визначено, що введення щурам ванкоміцину або сальмонел змінює як кількісний, так і якісний склад мікробіоти тонкого кишечника. Ці зміни проявлялися у збільшенні або зменшенні чисельності певних видів умовно-патогенних бактерій.

Також показано, що введення щурам ванкоміцину з сальмонелами і бактероїдами привело до суттєвих змін кишкового мікробіоценозу. А додаткове введення щурам *B. fragilis* обумовило зменшення вмісту ешерихій, ентеробактерів, клебсієл, шигели та сальмонел.

Автором отримано нові наукові дані та доведено, що зараження щурів сальмонелами на тлі попередньої обробки ванкоміцином безпосередньо впливає на зростання *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Acinetobacter* spp., *Cryptococcus neoformans*, які, у свою чергу, пригнічують ріст бактерій роду *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, і це доводить етіологію сальмонела-індукованого запалення кишечника. Також введення бактероїдів істотно впливає на конкуренцію між окремими групами мікроорганізмів, пригнічуючи ріст ентеробактерій та неферментуючих грамнегативних бактерій. При аналізі автором отриманих даних при обчисленні коефіцієнта Бергера-Паркера показано, що у тварин контрольної групи переважали мікроорганізми головної мікробіоти, а саме: *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *B. fragilis*, і становило 90-100 %. Бактерії, які відносять до супутньої мікрофлори (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *P.aeruginosa*), склали 30-89 %.

У розділі 4 при молекулярно-генетичному типуванні виділених штамів, яке є важливою складовою глобальної системи з наглядом за антибіотикорезистентністю мікроорганізмів, була визначена частота зустрічання генів резистентності у фенотипово резистентних штамів мікроорганізмів. Необхідно зазначити, що в процесі проведеної геноіндикації дані гени не визначались у 32 штамів бактерій родини *Peptostreptococcaceae*. Також гени *Van A* і *Van B* не зустрічались у 474 штамів ентеробактерій, у 71 штамів бактероїдів і у 39 штамів псевдомонад, що в черговий раз підтверджує факт наявності природної резистентності у даних мікроорганізмів до глікопептидних антибактеріальних препаратів, зокрема до ванкоміцину.

Таким чином, отримані результати в ході проведення молекулярно-генетичного дослідження свідчать про наявність генів резистентності до карбапенемів у штамів мікроорганізмів родин *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* і *Pseudomonadaceae* (*P. aeruginosae*), до цефалоспоринів - *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* і *Peptostreptococcaceae*, до ванкоміцину - у бактерій родини *Enterococcaceae*. Запропоновано, що призначення антибіотиків цих груп має проводитися з урахуванням результатів геноіндикації досліджуваних штамів.

Результати молекулярно-генетичних методів дослідження представлені в розділі 5. Отримані дані при проведенні цього методу свідчать про те, що антибіотико-індуковані зміни мікробіоти призводять до зниження у пристінковому вмісті кишечника кількості бактероїдів, ентерококів, пептострептококів і збільшення рівня ентеробактерій, протеїв, клебсієл і сальмонел. Введення *S. enteritidis* і *S. typhimurium* супроводжується збільшенням чисельності *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Peptostreptococcus anaerobius*. При введенні *S. enteritidis* і *S. typhimurium*, на тлі попередньої обробки ванкоміцином, виникає збільшення рівня *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., а також різко зменшується кількість *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *Proteus* spp., *Peptostreptococcus anaerobius*. Введення *B. fragilis* експериментальним тваринам, які отримували *S. enteritidis* або *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином, спричиняло зменшення рівня *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. і *Klebsiella* spp., а також збільшення *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium* і *Peptostreptococcus anaerobius*. Введення *B. fragilis* експериментальним тваринам, які отримували *S. enteritidis* або *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином, спричиняло зменшення рівня *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. і *Klebsiella* spp., а також збільшення *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium* і *Peptostreptococcus anaerobius*.

У шостому розділі дисертант описує розподіл ключових імунорегуляторних бактерій і їх вплив на транскрипційну активність генів FOXP3 і RORYT в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів. При проведенні молекулярно-генетичного методу визначення експресії мРНК гена *RORYt* дисертантка доводить, що введення тваринам ванкоміцину, сальмонел і *B. fragilis* сприяло зменшенню його рівня в експериментальних групах. Введення тваринам ванкоміцину і сальмонел обумовлювало кількісну зміну рівня ключових імунорегуляторних бактерій: збільшення рівня *SFB* і суттєве зменшення *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. При інфікуванні щурів *S. enteritidis* і *S. typhimurium*, на тлі попередньої обробки ванкоміцином, спостерігалася більш різка зміна в кількісному складі мікробіоти, що приводило до зменшення

рівня експресії мРНК генів *Foxp 3*<sup>+</sup> і збільшення *Roryt*<sup>+</sup> відповідно. Однак введення *B. fragilis* експериментальним тваринам, які отримували *S. enteritidis* або *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином, зменшувало рівні *SFB* і мРНК *Roryt*<sup>+</sup>, а також значно збільшувало представництво *Bacteroides-Prevotella group*, *A. muciniphila*, *Clostridium spp.* класу *XIV, IV*, *F.prausnitzii* й експресії генів *Foxp 3*<sup>+</sup>, що свідчить про відновлення гомеостазу кишкового мікробіома.

В ході проведення молекулярно-генетичних досліджень (розділ 7) автором визначено рівні експресії генів ефекторних білків *Sip A*, *Sop B* і *SopE 2* *S. enteritidis* і *S. typhimurium* на тлі попереднього введення ванкоміцину та показано, що попередня обробка експериментальних тварин ванкоміцином викликала посилення транскрипційної активності генів *Sip A*, *Sop B* і *SopE 2*, за винятком *Sip A*, після введення *S. enteritidis*. Проте при аналізі даних, отриманих при проведенні ПЛР-РВ, з'ясувалось, що рівень експресії ефекторних білків *Sop B* і *SopE 2* в цих же експериментальних групах статистично достовірно збільшився у 101 і 20 разів ( $p \leq 0,05$ ).

За допомогою проведення молекулярно-генетичного методу з використанням ПЛР-РВ визначено рівень експресії мРНК гена, який кодує рецептори коротколанцюгових вільних жирних кислот *FFAR 2*.

Проведений дисертанткою хромато-мас-спектрометричний аналіз показав, що введення *B. fragilis* тваринам, передобробленими ванкоміцином з подальшим інфікуванням *S. typhimurium*, обумовлювало збільшення рівня концентрації КЛЖК, що сприяло зниженню сальмонела-індукованого запалення і відновленню цілісності епітелію кишечника.

В розділі «Аналіз і узагальнення результатів дослідження» здобувач підводить підсумок проведених досліджень, аналізує отримані результати та проводить їх аналіз із використанням сучасних наукових публікацій. Завершується робота розгорнутими висновками, які в повній мірі відповідають поставленій цілі і задачам роботи, є логічними та відображують основні результати дисертаційної роботи. Виходячи з аналізу основної частини дисертації, можна зробити висновок, що мета дисертаційної роботи в ході виконання дослідження була досягнута, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею

#### **Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення.**

При рецензуванні дисертації виникли деякі зауваження стилістичного характеру (орфографічні помилки, випадки стилістичної неузгодженості, деякі невдалі вирази і терміни), які не впливають суттєво на узагальнену позитивну оцінку представленої роботи. При беззаперечній позитивній оцінці дисертації, у рамках наукової дискусії, бажано було б мати відповідь пошукувача на наступні запитання:

1. Який на вашу думку механізм впливу *B. fragilis* на кишковий мікробіом?

2. Чому саме Ви вибрали метод секвенування по 16S rDNA при проведенні ідентифікації мікроорганізмів?

**Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.**

Дисертаційна робота Букіної Юлії Вячеславівни на тему «Сальмонела-індуковані зміни кишкового мікробіому і транскрипції генів *FFAR 2*, *Foxp 3* і *RORγt* імунної відповіді», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія є самостійною завершеною науково-дослідною працею, що містить нові науково обґрунтовані результати. За актуальністю та медико-соціальною значущістю теми, обґрунтованістю наукових положень і висновків, достовірністю та новизною отриманих результатів, повнотою їх викладу в опублікованих працях, оприлюднення на медичних форумах, практичною значущістю дисертаційна робота відповідає вимогам пп. 9, 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567 зі змінами, а її автор Букіна Юлія Вячеславівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Зав. кафедри мікробіології, вірусології,  
епідеміології з курсом інфекційних хвороб  
медичного ф-ту УжНУ

*Kofur*

д.м.н., професор Г. М. Коваль

Підпис завідувача кафедри завіряю  
Вчений секретар УжНУ

*elllll*

О. О. Мельник

