

ВІДГУК

професора кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України, доктора медичних наук, професора Савінової Олени Михайлівни на кандидатську дисертаційну роботу Букіної Юлії Вячеславівни на тему «Сальмонела-індуковані зміни кишкового мікробіому і транскрипції генів FFAR 2, FOXP 3 і ROR_{γt} імунної відповіді» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія.

Актуальність теми

Значення дисертаційної роботи Букіної Юлії Вячеславівни полягає в тому, що автор поставив за мету з'ясувати закономірності сальмонела індукованих змін кишкового мікробіому та транскриптому деяких генів імунної відповіді щурів на тлі введення антибіотику ванкоміцину, сальмонел в умовах корекції мікроорганізмами роду *Bacteroides* в якості пробіотичного агенту.

Відомо, що сальмонельоз - це кишкова бактеріальна інфекція, яка розповсюджена в різних країнах світу. Незважаючи на багаточисленні наукові дослідження не вирішені питання зниження захворюваності цією інфекцією, продовжується формування і циркуляція антибіотикорезистентних штамів, що ускладнює лікування і обумовлює високі показники захворюваності.

Визначення змін мікрофлори кишківника при сальмонельозі - це дуже важливе направлення дослідження, бо відомо, що порушення мікробіому кишківника призводить до підвищення сприйнятливості до патогенної мікрофлори і розвитку інфекційного процесу. А саме, сальмонели відносяться до одного з патогенних мікроорганізмів сімейства *Enterobacteriaceae*.

Тому, слід зазначити, що робота є актуальною, виконана на сучасному розвитку галузі медичної мікробіології і відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки в Україні в боротьбі з інфекційними хворобами.

Дисертаційна робота виконана на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запоріжського державного медичного університету і є фрагментом наукової роботи кафедри (2018-2022р., № держ. реєстрації 0118U007141.) Дисертант є співпрацівником цієї теми.

При виконанні дисертації автором використані сучасні і адекватні методи дослідження, а саме: бактеріологічні, мікроскопічні, морфометричні, імунофлюоресцентні, спектрометричні, генетичні і математико-статистичні. Всі методи детально виписані, але на деякі достатньо було дати лише посилання на автора.

За даними 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.

Матеріали роботи пройшли апробацію на міжнародних та українських конференціях, з'їздах, а саме: в Запоріжжі 2016р,2018р, Москві-2017р., Германії-2017р, Харкові-2019р, Канаді-2019р, Карлових-Варах-2019р, Києві-2019р).

Наукова новизна

1. Вперше встановлено зміни у складі кишкового мікробіому видових і кількісних показників у щурів за умов розвитку сальмонела-індукованого запалення.

2. Вперше виявлено, що введення сальмонел на тлі переобробки ванкоміцином зумовлює більш швидку інновацію патогенну в епітеліоцити, що супроводжується зменшенням кількості бактероїдів, біфідобактерій, фекального ентерококу, пентострептококів і зростанням сальмонел, псевдомонад, клебсіел, ентеробактерів, ацитобактерів.

3. Вперше доведено, що при корекції C13K за допомогою введення культури *Bacteroides fragilis* відбувається зменшення *Salmonella* spp, *P.aeruginosa*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp і збільшення мікроорганізмів

головної групи: бактероїдів, біфідобактерій, лактобактерій, що підтверджено коефіцієнтом Бергера-Паркера.

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

Практичне значення.

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

Представлені результати також можуть бути взяті за основу 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.

Дисертація викладена на 246 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 38 рисунками, 17 таблицями, містить вступ, огляд літератури, розділ матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень і їх обговорення, висновки та список використаних джерел, яких налічує-383 найменування, з яких 10 написані кирилицею, 373 латиницею.

В огляді літератури висвітлені питання молекулярних механізмів взаємодії сальмонел з організмом господаря, представлені дані антибіотикорезистентності сальмонел і вплив сальмонел на склад кишкового мікробіому, визначені ключові імунорегуляторні бактерії і показана перспектива використання бактероїдів для корекції складу кишкового мікробіому.

У другому розділі освітлені загальні способи експериментальних досліджень, матеріали і методи, які дозволили автору виявити закономірності і

механізми змін мікрофлори і функціонального стану кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів за умов розвитку.

Матеріали і методи досліджень чітко виписані, що свідчить про високу кваліфікаційну підготовку дисертанта. На деякі методики достатньо було б тільки дати посилання на автора.

Отримані в процесі дослідження матеріали були опрацьовані за допомогою статистичного пакету ліцензійних комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і StatSoft Statistica v 12.

В розділі 3 представлені результати бактеріологічних методів досліджень. Визначено кількісний склад мікроорганізмів у пристінковому вмісті тонкого кишечника у щурів при введенні ванкоміцину і сальмонел і показані зміни як кількісного, так і якісного складу мікробіоти тонкого кишечника.

В подальшому представлені дані проведення досліджень по визначенню кількісного вмісту мікроорганізмів у кишковій мікробіоті після введення щурам сальмонел в поєднанні з антибіотиком. Показано, що спостерігалось зменшення кількості головної мікрофлори біфідобактерій, лактобактерій, бактероїдів до 40% і збільшення супутньої і залишкової мікрофлори. Корекція мікрофлори щурів *B.fragilis* зменшувало кількість сальмонел, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, та збільшувало *Bacteroides spp*, *Lactobacillus spp*, *Enterococcus spp*.

В 4 розділі проведено визначення генів резистентності у виділених в процесі дослідження ізолятів мікроорганізмів.

Визначення генів резистентності мікроорганізмів до антибіотиків карбепенелів, цефалоспоринів і глікопептидів проводили за допомогою ПЛР аналізу. Було відібрано 712 фенотипів резистентних штамів. Отримані результати свідчать про наявність генів резистентності до карбепенемів у штамів мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* і *Pseudomonadaceae*, до цефалоспоринів - *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* і *Peptostreptococcaceae*, до ванкоміцину - у бактерій родини *Enterococcaceae*.

Тому автор рекомендує призначати хворим антибіотики вищевказаних груп з урахуванням результатів геноіндикації досліджуваних штамів. Було б доцільним видати методичні рекомендації для лікарів різних спеціальностей.

Молекулярні механізми взаємодії сальмонел з клітинами організму господаря і представниками аутогенної мікрофлори визначають характер активації вроджених і адаптивних ланок кишково-асоційованої лімфоїдної тканини і впливають на результат інфекційного захворювання. Колонізація тканин господаря сальмонелами залежить від синтезу ними ряду чинників, гени яких розташовані в кластерах патогенності сальмонел, а саме гегі Sip A, Sop B і Sop E2 і які сприяють інвазії сальмонел у кишечник.

В розділі 7 дисертантом визначена експресія генів ефекторних білків сальмонел, формування нейтрофільних позаклітинних пасток та концентрації КЛЖК (коротко ланцюгових жирних кислот) у щурів на тлі введення ванкоміцину і *V.fragilis*. Були визначені рівні експресії генів ефекторних білків Sip A, Sop B і Sop E 2 *S.enteritidis* і *S. typhimurium* на тлі попереднього введення ванкоміцину. З'ясувалося, що попередня обробка тварин антибіотиком викликала посилення транскрипційної активності вищевказаних генів за винятком Sip A.

Введення ванкоміцину обумовлювало збільшення числа Sytox' клітин у скрібках зі слизової оболонки клубової кишки і в крові щурів після інфікування *S. enteritidis* і *S.typhimurium*, але кількість позаклітинних нейтрофільних пасток знижувалась.

Проведений хромато-мас-спектрометричний аналіз показав, що введення *V flagilis* тваринам, переобробленим ванкоміцином з подальшим інфікуванням *S. typhimurium* обумовлювало збільшення рівня концентрації КЛЖК (коротко ланцюгові жирні кислоти) які здатні активувати клітини КАЛТ (кишково-асоційованої лімфоїдної тканини) через рецептор FAR2.

Дослідження, які проведені за допомогою молекулярно-генетичного методу з використанням ПЛР, визначили рівень експресії мРНК гена, який кодує рецептори коротколанцюгових жирних кислот FFAR2, і показали, що в

експериментальних групах, де щури були переоброблені ванкоміцином і отримували суміш сальмонел з *Bacteroides fragilis* кількість мРНК гену FFAR2 збільшувалась.

Автор також виявив не тільки зростання коротколанцюгових жирних кислот, а і визначив концентрації ацету, пропіонату, бутирату, показники яких були в декілька разів вище у тварин, яким вводили ванкоміцин, сальмонели і *Bacteroides fragilis*.

Таким чином, в представленій дисертаційній роботі автором вирішені всі завдання і розкриті закономірності сальмонело-індукованих змін кишкового мікробіому транскрипції генів FFAR, Fjxp3 і ROR_{yt} імунної відповіді на тлі введення ванкоміцину і в умовах корекції *Bacteroides fragilis*.

Зауважень до тексту дисертації і автореферату немає, але в процесі рецензування виникло запитання: "Які особливості культури *B. fragilis* приваблюють, що вона може бути використана для виготовлення пробіотичного препарату."

Висновок

щодо відповідності дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Букіної Ю.В. «Сальмонела-індуковані зміни мікробіому та транскрипції генів FFAR 2, FOXP 3 і ROR_{yt} імунної відповіді» - є самостійною завершеною науковою працею, яка містить нові дані, щодо закономірностей сальмонело-індукованих змін кишкового мікробіому та транскрипції генів імунної відповіді у щурів на тлі введення антибіотику ванкоміцину і в умовах корекції *Bacteroidts fragilis*.

За своєю актуальністю, сучасним науково-методичним рівнем, новизною досліджень і практичним значенням вона цілком відповідає вимогам, щодо кандидатських дисертацій, які визначені в п.п. 11-13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 із змінами та у наказі МОН України №40 від

12.01.2017р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07.-мікробіологія.

Професор кафедри клінічної імунології
та мікробіології ХМАПО МОЗ України,
доктор медичних наук, професор



О.М. Савінова