

ВІДГУК

доктора медичних наук, професора, професора кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпровського державного медичного університету МОЗ України Кременчуцького Геннадія Миколайовича на дисертаційну роботу Горяник Інни Іванівни «Біологічні властивості *Babesia* spp. та підвищення ефективності діагностики бабезіозу» за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

Сучасні реалії світової цивілізації свідчать на користь активізації небезпечних, нових для людини та малодосліджених в цілому паразитарних інфекцій. Повсюдне розповсюдження паразитозів з експоненціальним збільшенням контингентів задіяних хворих (як тварин, так і людей), стрімке поширення ареалів інвазії з трансформацією останніх у статус латентних, ензоотичних/епідемічних та загрозливих осередків (наслідок науково-технічного прогресу) сприяє перетворенню локального соціомедичного питання у загальнодержавну проблематику. Гемопаразитарний бабезіоз є саме такою хворобою. В умовах сучасних мегаполісів густонаселених районів планети, де формуються потужні цілорічні факели тепла, відмічається нетипова сезонна динаміка бабезіозу, його патогенетичний сценарій набуває нових рис; змінюються специфіка клінічного перебігу; профіль нозологічного прототипу; інтенсивно поповнюється видовий спектр збудників (як етіологічних факторів тяжких (фульмінантних) та обтяжених форм хвороби). Все зазначене є зрозумілим наслідком низької поінформованості спеціалістів стосовно епізоотології/епідеміології бабезіозу, біологічних властивостей *Babesia* spp. та відсутності, а часом, об'єктивно унеможливленого проведення адекватної специфічної детекції бабезій. Натомість, новаторські тенденції у дослідженнях бабезіозу орієнтовані на систематику/таксономію відомих та виявлених *de novo* збудників, типи циркуляції у кліщах переносниках, пошук, аналіз та оцінку осередків заявленої інфекції.

На бабезіоз хворіють представники різних класів ссавців, існують повідомлення щодо реєстрації спорадичних випадків захворювання у птахів,

плазунів. Небезпека, пов'язана із бабезійними інвазіями, окреслюється ступенем агресивності збудників, що паразитують переважним чином у еритроцитах, плазмі крові. Патогенна дія цих паразитів дебютує потраплянням в сприйнятливий до нього організм зі слиною зараженого іксодового кліща, коли ті нападають на жертву з метою живлення. Відсутність адекватної діагностики та опрацьованих протоколів призводить до розвитку затяжних / хронічних форм інвазії, відчутного посилення імуносупресії (на тлі проведеної спленектомії, детекції вірусу імунodefіциту, вірусного гепатиту С, тривалих гемотрансфузій, трансплантацій аутологічних клітин, внутрішніх органів та їхніх фрагментів) летального виходу.

Профільні фахівці наголошують на виключному негативізмі у настроях деяких медичних співтовариств щодо БІ, сталому ігноруванні «нозологічного мотиву», відвертому нехтуванні об'єктивними даними патологоанатомічних досліджень за паразитогами. Додаткової гостроти проблемі додають наявність супутньої / коморбідної патології (що розмиває клініко-патогенетичний профіль БІ), навмисне унеможливлення пацієнтом / постраждалим від нападів активних стадій кліщів досягнення анамнестичної доброчесності. До цього слід додати також проблему, пов'язану із перебуванням у тіні сучасних досліджень у сфері молекулярної діагностики (ПЛР), низький обхват об'єктів лабораторної діагностики (ІФА) бабезійного паразитозу. До цього слід додати також відповідність теми дослідження окремим із визначених, як стратегічні, пріоритетним напрямкам, зокрема, Указу президента України №369/2021 Про рішення Ради національної безпеки і оборони України від 30 липня 2021 року "Про стан національної системи охорони здоров'я та невідкладні заходи щодо забезпечення громадян України медичною допомогою".

Зважаючи на все викладене вище, низьку поінформованість спеціалістів щодо біологічних властивостей збудників *Babesia* spp., сучасних ефективних методів діагностики бабезіозу, актуальність започаткованого дослідження не викликає жодного сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота Торяник І.І. є фрагментом прикладної НДР ДУ «ІМІ НАМН» ЛНМІЗ «Розробка методів лабораторної діагностики бабезіоза» (№ держреєстрації 0114U000242), відповідно до цього мала державне фінансування.

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень, висновків і рекомендацій, їх достовірність і новизна. Для досягнення поставленої мети – вивчити біологічні властивості *Babesia* spp. та на їх основі удосконалити діагностику бабезіозу були визначені певні завдання (дослідити культуральні особливості *Babesia* spp., провести молекулярно-генетичну верифікацію видової належності культур їх патогенетично значущих штамів, проаналізувати антигенні властивості *Babesia* spp. та серологічні параметри у сприйнятливих до їхнього впливу імунокомпетентних / імунокомпрометованих особин / осіб хворих на бабезіоз та з підозрами щодо захворювання на нього, вивчити інокуляційні властивості збудників, з'ясувати специфіку ультрамікроскопічного профілю еритроцитарної ланки у хворих на бабезіоз та коморбідних до нього станів). Останнє зумовлювало доволі репрезентативну кількість експериментальних досліджень, клінічних спостережень (n=519), використання комплексу сучасних адекватних високоінформативних методів дослідження – бібліосемантичних, культуральних, молекулярно-генетичних, серологічних, мікроскопічних, цитологічних, ультрамікроскопічних, математико-статистичних. Отже, достатній обсяг проведених спостережень та експериментів, ґрунтовна методологічна база, адекватна статистична обробка результатів дали змогу підтвердити достовірність зроблених автором висновків, що цілком відповідають меті та поставленим завданням.

Наукова новизна роботи полягає у :

- здійсненні молекулярно-генетичної верифікація видової належності культур патогенетично значущих штамів *Babesia* spp. (видів *B. microti*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. canis*) для українських еко- / біотопів;

- застосуванні мікроаерофільної стаціонарної фази в етіопатогенетичній діагностиці бабезіозу та об'єктивній аргументації здатності найпростіших *Babesia* spp. до безстатевого розмноження;

- розширенні сучасних поглядів на антигенні властивості *Babesia* spp., суттєвому удосконаленні (за рахунок застосування повних комбіновано-клітинних антигенів бабезій) серологічних методів дослідження параметрів імунітету у імунокомпетентних / імунокомпрометованих особин / осіб за умов бабезійної інвазії / підозри на користь щодо неї;

- дослідженні морфологічних аспектів впливу факторів патогенності бабезій на прикладі тропних їм органів;

- удосконаленні детекції специфічних та неспецифічних включень в еритроцити;

- розширенні наукових даних щодо впливу *Babesia* spp. на морфологічний стан еритроцитів у разі бабезіозу;

- дослідженні ультрамікроскопічного профілю еритроцитів периферичної крові за умов бабезіозу та маркерних / коморбідних / супутніх йому станів (вперше у світі), отримані нових даних щодо патології розмірів та форми, змін фізико-хімічних властивостей еритроцитарних мембран;

- встановленні сигнальних маркерів бабезійної інвазії (запально-дистрофічні, некротичні, атрофічні та запально-алергічні реакції) у ділянках нападів активних стадій кліщів шкіри сприйнятливих до *Babesia* spp. особин (на прикладі свійських / домашніх собак);

- поглибленні знань щодо найпоширенених неспецифічних морфологічних маркерів (некроз, субкапсулярні крововиливи, фолікулярна гіперплазія, лейкоцитарна та макрофагальна реакція, крововиливи) бабезійної інфекції у тропних органах / клітинах сприйнятливого організму;

- конкретизації співвідносної тропності збудників бабезіозу (*Babesia* spp.: *B. microti* і *B. divergens*) родинній систематиці тварин-годувальників (мишоподібних гризунів родини *Muridae* родів *Myodes*, *Microtus*, *Apodemus*, *Sylvaemus*), їхніх біологічних переносників (кліщів надродини *Ixodoidea* родини

Ixodidea) з метою оптимізації етіологічної діагностики бабезіозу зазначеного кліщового паразитозу;

- визначенні та верифікації (вперше на теренах України) ролі кліщів *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus* та *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor pictus* як резервуарів для збудників (*Babesia* spp.: видів *B. microti*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. canis*), з огляду на інокуляцію останніх в організм згаданих кровосисних членистоногих та міграцію в ньому (кишка, її епітелій, гемолімфа, слинні залози);

- розвитку концепт ролі антропогенних факторів впливу у формуванні патогенетичного профілю та нозологічного прототипу бабезійної інфекції, визначенні місця та значення останніх у діагностичному алгоритмі об'єктивних даних епідемічного анамнезу за групами ризику по захворюванню (спленектомія, бореліоз або хвороба округу Лайм, токсоплазмоз, ревматоїдний артрит) та способам інфікування (гемотрансфузії);

- розробці та опрацюванні уніфікованого алгоритм комплексної клініко-лабораторної діагностики бабезіозу.

Практичне значення

Нові дані, отримані у дисертації Торяник І.І., об'єктивно розширюють існуючі уявлення щодо біологічних властивостей *Babesia* spp, їхньої ролі у розвитку відповідного нозологічного прототипу, визначають нові напрями етіопатогенетичної діагностики, можливої корекції структурно-метаболічних та функціональних порушень, зміцнюють доказову базу потенційних заходів прогнозу та профілактики бабезіозу (авторкою отримано патент України на корисну модель: «Спосіб детекції патогенних для людини бабезій за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції», 2017).

Певного практичного сенсу набуває створена в експерименті на лабораторних тваринах (золотистих сірійських хом'яках, монгольських піщанках, нелінійних білих лабораторних мишах) уніфікована модель бабезіозу.

Очевидну практичну доцільністю мають визначені видова тропність, специфічність збудників стосовно систематики тварин-годувальників

(резервуарів), їхніх біологічних переносників.

Практично значимим є морфологічне визначення всіх трьох ланок ензоотичного / епідемічного ланцюга, відстеження рівня захворюваності тварин на бабезіоз для надання оптимальної ензоотичної / епідемічної оцінки ареалу.

Практичного значення також набувають морфологічні критерії дифдіагностики бабезіозу, його латентних, безсимптомних, маркерних / коморбідних / супутніх форм; удосконалений цитологічний аналіз еритроцитарної ланки гемопоезу як субстрату репродукції *Babesia* spp. Доречним є використання сигнальних маркерів Бі у шкірі, серед яких фігурують морфологічні зміни у шкірі сприйнятливою до активних нападів кліщів організму.

Важливими критеріями прогнозу ризику захворюваності на бабезіоз, тяжкості клінічного перебігу останнього є серологічні дослідження імунокомпетентних / імунокомпрометованих особин / осіб.

Доцільним, з точки зору експериментальної практики, є впровадження опрацьованої *in vivo* культуральної методики, що претендує на статус безсумнівного критерію етіологічної діагностики бабезіозу.

Уточненню видової належності *Babesia* spp. та генетичному моніторингу їхньої циркуляції в ареалах існування окремих популяцій людей / тварин сприяє практичне застосування результатів молекулярно-генетичних методів.

Підсумком до викладеного вище є той факт, що основні результати розробок знайшли своє застосування у науково-практичній діяльності лікувально-профілактичних закладів охорони здоров'я України, використовуються в навчальних програмах профільних медичних вишів.

Повнота висвітлення результатів дисертаційного дослідження в опублікованих працях (наукових фахових виданнях) та авторефераті. Основні наукові положення, висновки й отримані результати повною мірою висвітлені у 47 наукових працях (12 одноосібно), із них 3 монографії (2 зарубіжні), 21 стаття у наукових фахових виданнях (6 публікацій у виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази Scopus, 3 - Web of Science, 1

публікація у зарубіжному виданні, 11 статей у вітчизняних фахових виданнях, включених до інших міжнародних наукометричних баз), отримано один патент України на корисну модель, опубліковано 20 тез в матеріалах міжнародних та Українських науково-практичних конференціях, з'їздах, конгресах симпозіумах, семінарах. Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи неодноразово доповідалися й обговорювалися на багатьох науково-практичних конференціях, з'їздах, в тому числі й з міжнародною участю. Автореферат дисертаційної роботи оформлено згідно вимог ДАК України, він відповідає її змісту та повністю висвітлює результати та основні наукові положення дисертаційної роботи.

Структура дисертації та загальна характеристика роботи.

Дисертаційна робота написана за класичним планом, викладена на 415 сторінках комп'ютерного тексту. Вона складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів, восьми розділів власних досліджень, висновків і рекомендації, списку використаних джерел літератури з 446 посиланнями (із них 83 – кирилицею, 353 – латиною). Роботу ілюстрована 80 рисунками та 38 таблицями, вона містить 3 додатки. У вступі обґрунтовується актуальність теми дослідження. У ньому чітко і лаконічно визначено мету, окреслений шлях її реалізації (8 завдань). Вони сформульовані коректно, їхнє виконання, сприяє досягненню мети. Вичерпно представлені авторкою наукова новизна і практична значимість роботи, чітко окреслений особистий внесок автора у виконанні досліджень.

У розділі, що присвячений аналізу літератури, представлена історія питання етіопатогенетичні, номологічні, диспозиційні пояснення розвитку бабезіозу, узагальнені сучасні уявлення щодо біологічних властивостей *Babesia spp.*, наведені новаторські методологічні підходи у їхніх дослідженнях, ґрунтація складових потенційних діагностичних алгоритмів. Текст викладений логічно, чітко із добрим розумінням матеріалу та профільних відповідно до тематики дисертації науково-теоретичних джерел.

Розділ за матеріалом та методами досліджень містить детальну

характеристику об'єктів, інструментів, реактивів, методологічного спектру (*in vitro* та *in vivo*); його панорамно ілюстровано рисунками, таблицями, діаграмами. Відкриває розділ програма досліджень представлена змістовною схемою.

Третій розділ роботи містить результати за культуральними методами (із застосуванням технології MASP), завдяки чому було показано здатність найпростіших до безстатевого розмноження *in vitro* на біолологічних поживних середовищах із вмістом еритроцитів сприйнятливих хребетних хазяїв; роль еритроцитів як зручних по відношенню до бабезій таргетних клітин. Дані за розділом об'єктивно підтверджують роль культурального методу як безсумнівного лабораторного критерію етіопатогенетичної діагностики бабезіозу.

Четвертий розділ висвітлює результати молекулярно-генетичних методів досліджень з ідентифікацією (рівень специфічності - 100 %) декількох домінуючих патогенних для людини видів бабезій (*B. microti*, *B. divergens* + *B. venatorum*). Завдяки виконаному фрагменту ґрунтовно підтверджено діагностичну ефективність методу у випадках стійкої підозри на бабезіоз (на тлі негативних результатів мікроскопічних / цитологічних досліджень), що сприяло верифікації активної інвазії у серопозитивних осіб.

У п'ятому розділі проведена оцінка антигенних властивостей *Babesia* spp., стану специфічної імунної резистентності з визначенням рівня специфічних імуноглобулінів IgG / IgM. Отриманню позитивних результатів сприяло застосування комплексу повних клітинно-комбінованих антигенів бабезій та детекція останніх із застосуванням флуоресцентних барвників. Розділ відповідним чином візуалізований фото світлинами, таличним та діаграмним матеріалами.

Шостий розділ розкриває певні аспекти інокуляційних властивостей *Babesia* spp. на прикладі еритроцитарної ланки гемопоезу. В ньому міститься суттєвий матеріал за патологією розмірів та форми еритроцитів (анізо-, поїкілоцитоз, феномен формування «монетних стовпчиків», розташування

еритроїдних клітин на склі), окремі якісні та кількісні параметри лейкоцитарної популяції, клітин гемостазу. Розділ долучає декілька комплексних фотосвітлин, серію таблиць, діаграмний матеріал.

Сьомий розділ є втіленням результатів ультрамікроскопічних досліджень (ресурсами растрової електронної мікроскопії). Дисертанткою вперше у світі виконаний аналіз ультрамікроскопічного профілю еритроцитарної ланки гемопоезу не лише на прикладі хворих на бабезіоз особин/осіб, але й із супутньою патологією (бореліоз, токсоплазмоз, спленектомія, ревматоїдний артрит). Розділ вкрай доцільно ілюстрований ультрамікросвітлинами.

У восьмому розділі детально представлена інформація за результатами вивчення впливу факторів патогенності бабезій на тропні/таргетні їм органи сприйнятливого макроорганізму (лімфатичні вузли, селезінка, печінка, лімфоїдний апарат шлунка, тонкої кишки, внутрішньоорганні судини, шкіру). Для досягнення поставленої мети авторка вдало користується резервами системного підходу, аналізуючи потенціал біологічних властивостей *Babesia* spp. у ланцюгу : збудник-переносник-резервуар. Слід відзначити, що згаданий прийом у відповідних дослідженнях застосовується вперше. Розділ сприяє цілісному уявленню щодо характеру змін, які відбуваються у тропних/таргетних бабезіям органах (розм'якшення паренхіми, розриви, запалення, набряк, «генералізована ішемія без оклюзії», субкапсулярні / крапчасті крововиливи, неспецифічна фолікулярна гіперплазія лімфоїдної тканини, лейкоцитарна / макрофагальна реакції, наявність еозинофілів у слизових, десквамація та везикуляція ендотелію, пористість судин, крововиливи) та зумовлені міграцією *Babesia* spp. в організмі сприйнятливих осіб/особин. Вони мають органотипічний характер, є стартом для розвитку лихоманково-інтоксикаційного, жовтяничного, гепатолієнального синдромів, лімфаденопатії, синдрому ураження шлунково-кишкового тракту.

Дев'ятий розділ є певним підсумком результатів за комплексом досліджень щодо біологічних властивостей *Babesia* spp., які створили

фундамент для розробки та подальшого опрацювання уніфікованого діагностичного алгоритму.

Схвально сприймається десятий розділ роботи, в якому йдеться щодо аналізу та обговорення отриманих результатів. Його текст викладений логічно, послідовно, легко сприймається, оздоблений 6-ма схемами - рисунками.

Завершують роботу висновки та практичні рекомендації, які повністю відображають результати проведених досліджень.

Як і у всьому науковому дослідженні, у представленій роботі є певні недоліки, але ж вони носять поодинокий характер, не є системними, стосуються окремих мовних неточностей, механічних помилок і не применшують наукової та практичної значимості роботи.

У разі ознайомлення із текстом дисертаційної роботи виникли окремі запитання:

1. Чим саме Ви пояснюєте тотальну відсутність збудників у мікроскопічних препаратах органів, тропних бабезіям?
2. Яка доцільність контролю донорської крові?
3. Які інші види кліщів як векторів передачі бабезіозу становлять небезпеку в Україні та Європі?
4. Чи є на сьогодні доцільним створення специфічної антибабезійної вакцини?

Рекомендації щодо використання дисертаційного дослідження в практиці.

Положення дисертаційної роботи мають міжгалузеве значення та, безперечно, знайдуть застосування у практичній галузі медичної науки (клінічній мікробіології, паразитології, лабораторній діагностиці, клініці інфекційних/ внутрішніх хвороб, сімейній медицині, дерматології). До числа таких аспектів можна віднести:

- застосування мікроаерофільної стаціонарної фази у етіопатогенетичній діагностиці бабезіозу, аргументації здатності найпростіших *Babesia* spp. до безстатевого розмноження;

- молекулярно-генетична верифікація видової належності культур патогенетично значущих штамів *Babesia* spp. (видів *B. microti*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. canis*) в умовах українських еко- / біотопів;
- використання для серологічних досліджень діагностикумів повних комбіновано-клітинних антигенів бабезій;
- шкірні ушкодження як діагностичні критерії та сигнальні маркери нападів активних стадій кліщів;
- мікроскопічні зміни (як неспецифічні маркери) тропних / таргетних до бабезій внутрішніх органів сприйнятливих особин/осіб за умов перебігу БІ;
- комплексний підхід у цитологічній діагностиці БІ;
- ультрамікроскопічна діагностика еритроцитів клінічно здорових донорів та осіб із мікст-інфекцією (коморбідна, маркерна, супутня патологія);
- модель бабезіозу на лабораторних тваринах;
- уніфікований клініко-діагностичний алгоритм БІ;

Автореферат дисертаційної роботи оформлено згідно вимог ДАК України, відповідає її змісту та повно висвітлює результати та основні наукові положення роботи.

Відповідність напрямку досліджень і змісту дисертації паспорту спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради.

Напрямок і зміст дисертаційної роботи на тему: «Біологічні властивості *Babesia* spp. та підвищення ефективності діагностики бабезіозу» повністю відповідає паспорту спеціальності 03.00.07 – мікробіологія та профілю спеціалізованої вченої ради.

Дані про відсутність порушень академічної доброчесності. Розглянувши дисертаційну роботу Торяник Інни Іванівни «Біологічні властивості *Babesia* spp. та підвищення ефективності діагностики бабезіозу» відмічено, що при комп'ютерному тестуванні електронного формату дисертації та наявних за її темою публікацій за допомогою системи «Strike Plagiarism» академічного плагіату в наданих матеріалах дисертації не виявлено. Текст

представлених матеріалів дисертації є оригінальним, цитати правильно і коректно позначені та відображені в списку літератури, всі текстові співпадіння мають відповідні посилання на першоджерело, що міститься в списку використаних робіт. Отже, дисертаційну роботу слід визнати самостійною науковою працею.

Висновок: Дисертація Торяник І. І., подана на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук, є актуальною, самостійною, завершеною науковою працею, виконаною на сучасному науково-методичному рівні. Робота містить систематизовані інформаційно-аналітичні матеріали, нові експериментальні результати та наукові узагальнення, сукупність яких розв'язує важливу науково-практичну проблему - вивчення біологічних властивостей збудників *Babesia* spp. та підвищення ефективності діагностики бабезіозу. Отже, робота Торяник І. І. «Біологічні властивості *Babesia* spp. та підвищення ефективності діагностики бабезіозу» є такою, що у цілому відповідає вимогам щодо докторських дисертацій, які визначено в пп. 10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 із змінами та у Наказі МОН України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій», від 12.01.2017 р. №40, а її автор заслуговує на ступінь доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Професор кафедри мікробіології,
вірусології, імунології та епідеміології
Дніпровського державного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор

Кременчуцький Г. М.

