

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, професора кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» Кременчуцького Геннадія Миколайовича на дисертаційну роботу Калініченко Світлани Вікторівни «Мікробіологічне обґрунтування нових підходів до подолання стафілококового носійства за допомогою лактобацил та поверхневих мікробних антигенів», 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 доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Актуальність теми

Стафілококи, які належать до умовно патогенних мікроорганізмів, нерідко є причиною різноманітних форм гнійно-септичних захворювань. Стафілококова інфекція залишається однією з найбільш поширених і наносить значний соціальний та економічний збитки суспільству. Трудові втрати при стафілококових інфекціях переважають втрати від гострих кишкових захворювань у 30-40 разів. Серед стафілококів *Staphylococcus aureus*, займає провідне місце як етіологічний фактор захворювань людини, який може вражати практично всі тканини і органи людини. Основним джерелом *S. aureus* є назальні носії. Епідеміологічні дослідження засвідчують, що 20 % населення є резидентними носіями стафілококів, 70 % - транзиторними, і тільки в 10 % стафілокок постійно не виявляється. значення має носійство золотистого стафілокока серед медичного персоналу, а також студентів, які постійно відвідують клінічні бази, адже це підвищує ризик виникнення внутрішньолікарняних інфекцій, що є гострою проблемою сучасної медицини. Бактеріоносійство є особливою формою бактеріальної інфекції, при якій виникає динамічна рівновага між мікроорганізмами та організмом господаря. В останні 10-15 років вивченню проблеми бактеріоносійства взагалі та *S. aureus* зокрема, приділяється значна увага.

Розробка нових підходів для профілактики і боротьби зі стафілококовим носійством є актуальною проблемою, оскільки усі методи, що використовувались до цього часу, не давали бажаного результату. Саме тому щодо удосконалення способів санації носіїв *S. aureus* вимагає обґрунтованого комплексного підходу, який би врахував особливості біологічних властивостей збудника, стану імунного протиінфекційного захисту організму носія та елімінуючу здатність препарату. Пошукові дослідження останніх років дозволяють зробити припущення про можливість використання поверхневих мікробних антигенів і пробіотичних штамів, як регуляторів мікробіоценозів, що перешкоджатиме носійству *S. aureus* серед декретованих прошарків населення та сприятиме розповсюдженню нозокоміальних інфекцій стафілококового генезу в лікувально-профілактичних закладах тощо. Вищезазначене змушує визнати обрану для дисертаційної роботи тему вельми актуальною.

Зв'язок теми дисертації з науковими темами, планами, програмами

Дисертаційна робота Калініченко С. В. виконана у рамках виконання науково-дослідних робіт ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»: «Застосування електромагнітних полів (ЕМП) для посилення утворення окремих метаболітів та підвищення стабільності біологічних властивостей їх продуцентів» (№ держреєстрації 0107U001639); «Біологічні основи розробки синбіотичних комплексів за умов застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль» (№ держреєстрації 0113U001517) та «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів» (№ держреєстрації 0116U000864).

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень, висновків і рекомендацій, їх достовірність і новизна

Для досягнення поставленої мети, а саме удосконалення профілактики і боротьби зі стафілококовим носійством, були визначені завдання, які включали вивчення видового складу представників мікробіоценозів верхніх

дихальних шляхів (ВДШ) з визначенням популяційного рівня *S. aureus* і *Lactobacillus* spp.; пошук нових штамів *Lactobacillus* spp., що можуть бути використані як пробіотичні, отримання поверхневих антигенів *S. aureus* за допомогою фізичних чинників, що надає змогу одержувати нативні бактеріальні антигени; характеристика імунобіологічних властивостей компонентів експериментальних зразків кандидат-вакцини; розробка відтворювальних лабораторних моделей для вивчення ефективності експериментальних зразків мукозальної кандидат-вакцини.

В процесі виконання досліджень проведено всебічне клініколабораторне обстеження 288 пацієнтів, що знаходились на амбулаторному лікуванні у відділенні отоларингології Комунального неприбуткового підприємства Харківської міської ради «Харківська міська студентська лікарня» у 2012-2016 роках, виділено і досліджено 1160 клінічних ізолятів бактерій.

Аналіз результатів дисертаційної роботи Калініченко С. В. дає змогу визначити, що всі завдання, поставлені автором, були виконані у достатньому обсязі експериментів з використанням сучасних і адекватних методів дослідження – мікробіологічних, фізико-хімічних (спектрофотометричний метод, рідинна гель-хроматографія, хромато-мас-спектрометрія, ДСН-ПААГ-електрофорез), молекулярно-генетичних, імунологічних, математико-статистичних.

Наукова новизна та теоретичне значення дослідження

Вперше теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено кардинально новий підхід щодо удосконалення методів профілактики стафілококового бактеріоносійства. Запропоновано мукозальну кандидат-вакцину з антиадгезивним і пробіотичним компонентами.

Показано, що існуюча стратегія ерадикації *S. aureus* не перешкоджає носійству *S. aureus* серед декретованих прошарків населення та сприяє розповсюдженню нозокоміальних інфекцій стафілококового генезу в

лікувально-профілактичних закладах країни, дитячих колективах, вищих
учбових закладах тощо.

Значно поглиблено рівень знань відносно популяційного рівня
Lactobacillus spp. на слизових оболонках ВДШ за умов хронічної ЛОР-
патології. Встановлено, що частота виділення представників роду
Lactobacillus зі слизових оболонок зіву і носа у хворих з ЛОР-патологією та
носіїв була значно нижче порівняно з показниками практично здорових осіб.

Розширено сучасні погляди на регуляторні реакції мікроорганізмів в
залежності від змін умов оточуючого середовища. Вивчено вплив
бактеріальних токсинів (дифтерійного екзотоксину та ЛПС *E. coli* 126) та
умов газового складу атмосфери інкубації на біологічні властивості (ростові,
адгезивні і антикомплементарні) певних видів мікроорганізмів. За
авторським способом вивчено здатність пробіотичної флори і патобіонтів до
утилізації глюкози, що є показником потенційного розвитку субпопуляцій.
Зазначене поглиблює рівень знань щодо міжмікробних взаємовідносин, які
побудовані на антагоністичних і регуляторних властивостях асоціантів.

На основі авторського способу моделювання адгезивних властивостей
мікроорганізмів вперше визначено оптимальний режим застосування двох
фізичних чинників (електромагнітних хвиль міліметрового діапазону і
ультразвуку) для отримання поверхневих антигенів бактерій з
антиколонізаційними властивостями та вперше одержано хімічно не змінені
(нативні) поверхневі антигени *S. aureus*, як можливі платформи для
створення нового класу неін'єкційних імунобіологічних препаратів.

Вперше вивчено біохімічний склад безклітинних супернатантів (БС)
Lactobacillus spp. (Лас), отриманих за різних умов газового складу атмосфери
культивування продуцентів та безклітинних антигенних комплексів (БА)
S. aureus, отриманих за допомогою фізичних чинників, їх імунобіологічні
властивості. За результатами проведеного *in vivo* імунобіологічного
скринінгу вперше встановлено специфічну нешкідливість отриманих
оригінальним способом БС і БА у тестах визначення загальнотоксичної та

дерматонекротичної дії та можливість тривалого назального застосування за умови суворого дозування.

Вперше, на розроблених лабораторних моделях, показано, що експериментальні зразки БС і комплексів БС+БА або Лас+БА (мукозальна кандидат-вакцина) здатні регулювати біоценози слизових оболонок ВДШ при стафілококовому носійстві та відновлювати їхню протиінфекційну резистентність шляхом повної елімінації *S. aureus*, встановлено підвищення популяційного рівня *Lactobacillus* spp., відновлення показників місцевого імунітету. На основі авторського способу моделювання стафілококового бактеріоносійства вперше показана імунобіологічна активність (антиколонізаційна активність відносно золотистих стафілококів і здатність відновлювати протиінфекційну резистентність (рівні sIgA і лізоциму) слизових оболонок ВДШ) експериментальних препаратів шляхом тривалого моніторингу (90 діб) елімінації збудника зі слизових оболонок лабораторних тварин. Тобто, вперше показано ефективність інтраназальної форми для імунопрофілактики/лікування стафілококового бактеріоносійства з одночасним відновленням мікробіоценозу слизової оболонки та стимулюванням місцевих ланок імунної системи.

Вперше досліджено біологічні і молекулярно-генетичні властивості штаму авторського колективу *Lactobacillus plantarum* ІМВ В-7679, виділеного з кишечника бджіл, встановлено безпечність і нешкідливість зазначеного штаму та обґрунтовано його можливість використання як пробіотичного штаму. Встановлено високу антагоністичну здатність штаму *L. plantarum* ІМВ В-7679 відносно представників родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* і *Escherichia*. Зазначені біологічні властивості надають змогу рекомендувати штаму авторського колективу *L. plantarum* ІМВ В-7679 як вітчизняний пробіотичний штаму при розробці нових пробіотичних препаратів.

Наукова новизна підтверджена 1 патентом на винахід: «Спосіб модуляції адгезивних властивостей мікроорганізмів»; 5 патентами на

корисну модель: «Поживне середовище для одночасного виявлення гемолітичної та лецитиназної активностей мікроорганізмів», «Спосіб визначення катаболічної активності мікроорганізмів», «Спосіб одержання моделі хронічного тонзиліту», «Спосіб одержання лабораторної моделі хронічного назального носійства стафілококового генезу у кролів», «Композиція інгредієнтів фітобіотику VITUS-LACT» та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я.

Повнота висвітлення результатів дисертаційного дослідження в опублікованих працях (наукових фахових виданнях) та авторефераті

Основні наукові положення, висновки й отримані результати повною мірою освітлені в 60 наукових працях, в тому числі: 1 зарубіжна колективна монографія (моноавторство), 32 статті (3 - у моноавторстві), з них 23 у наукових фахових виданнях України (12 входять до міжнародних наукометричних баз), 9 – в іноземних фахових наукових журналах (3 статті у виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus); 1 патенту України на винахід; 5 патентів України на корисну модель; 1 інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я; 1 свідоцтва про первинне депонування штаму; 4 галузевих нововведень у сфері охорони здоров'я; 2 методичні рекомендації; 13 тезах. Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи неодноразово доповідалися й обговорювалися на багатьох науково-практичних конференціях, з'їздах, конгресах, семінарах, в тому числі й з міжнародною участю. Автореферат дисертаційної роботи оформлено згідно вимог ДАК України, відповідає її змісту та повно висвітлює результати та основні наукові положення дисертаційної роботи.

Структура дисертації та загальна характеристика роботи

Дисертаційна робота написана за загальноприйнятим для таких робіт планом, викладена на 407 сторінках друкованого тексту, містить вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, шість розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки та

рекомендації, список використаних першоджерел (55 сторінок) з 504 посиланнями. Робота містить 80 таблиць і 48 рисунків та три додатки.

Вступ містить обґрунтування актуальності теми дисертаційного дослідження. У вступі лаконічно і чітко визначено мету дослідження, досягнення якої дозволяє вирішити важливу наукову проблему. Завдання дослідження сформульовані правильно, їх виконання, дозволяє досягти мети. Вичерпно викладено наукову новизну і практичну значимість роботи, особистий внесок автора у виконання досліджень.

У розділі «*Огляд літератури*» наведено сучасні уявлення щодо поширеності стафілококового бактеріоносійства серед декретованого контингенту та мікроекологічних аспектів слизових оболонок верхніх дихальних шляхів при хронічних інфекціях стафілококового генезу, висвітлено роль лактобацил у підтримці гомеостазу макроорганізму та механізми активації тол-подібних рецепторів (TLR), розгорнуто надані сучасні напрямки створення, удосконалення та застосування пробіотичних, пребіотичних і синбіотичних препаратів, в тому числі за допомогою фізичних чинників .

У розділі «*Матеріали та методи досліджень*» автор надає відомості про контингент обстежених та методи, які були використанні при виконанні роботи. Методи адекватні та досить інформативні. Особливу увагу автор приділяє авторській методиці щодо вивчення здатності пробіотичної флори і патобіонтів до утилізації глюкози, що є показником потенційного розвитку субпопуляцій, авторському способу моделювання адгезивних властивостей мікроорганізмів, завдяки чому одержано хімічно не змінені (нативні) поверхневі антигени *S. aureus* та розробці лабораторних моделей для вивчення імунобіологічної активності та ефективності експериментальних зразків протистафілококових препаратів.

Третій розділ дисертаційної роботи присвячений висвітленню результатів власних досліджень особливостей відового складу представників мікрофлори слизових оболонок. Автором показано, що ступінь заселення

лактобацилами у хворих відповідно становив $(2,7 \pm 0,4)$ Ig КУО/г та $(3,7 \pm 0,9)$ Ig КУО/г проти $(6,64 \pm 0,9)$ Ig КУО/г у практично здорових осіб. У бактеріоносіїв *S. aureus* кількість лактобацил становила $(2,2 \pm 0,6)$ Ig КУО/г. Надано характеристику факторів патогенності штамів *S aureus* за умов різного газового складу атмосфери культивування та показано, що за умов мікроаерації відбувається зміна активності ферментних систем бактеріальних клітин.

Розділ 4 дисертаційної роботи присвячено результатам дослідження впливу бактеріальних токсинів як індукторів антагоністичних міжмікробних взаємовідносин. У розділі наведено дані щодо біологічних властивостей певних представників грамнегативних і грампозитивних бактерій. Проведено дослідження кінетики росту, адгезивноколонізаційного потенціалу взятих у досліді штамів, їх анти комплементарну активність. Отримані дані розширюють знання щодо міжмікробних взаємовідносин в складних мікробних спільнотах.

У *п'ятому розділі* викладено результати пошуку штамів-кандидатів лактобацил з альтернативних еконіш, надано їх біологічну характеристику, визначено конкуренту активність ізолятів. За мікробіологічним скринінгом відібрано штами-кандидати в пробіотичні, надана їх молекулярно-генетична характеристика та характеристика їх біологічних властивостей за умов різного газового складу умов культивування. Отримані результати дозволили депанувати штам авторського колективу *L. plantarum* ІМВ В-7679 як пробіотичний до Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології НАН України в Українську колекцію мікроорганізмів непатогенних для людини.

Розділ 6 висвітлює особливості міжмікробних взаємовідносин лактобацил і золотистих стафілококів на прикладі впливу метаболітів лактобацил на фактори патогенності клінічних ізолятів *S. aureus* та регуляції функціонально-метаболічної активності фагоцитів. У цьому розділі також надано результати оцінки цитотоксичної дії метаболітів лактобацил *in vitro* та їх хроматографічний аналіз. Автором показано, що отримані зразки

безклітинних супернатантів (БС) пригнічують здатність тест-штамів *S. aureus* до колонізації і біоплівкоутворення, знижують їх фактори патогенності та водночас стимулюють функціонально-метаболічну активність фагоцитів.

У цьому розділі проведено визначення оптимальних режимів отримання поверхневих антигенів *S. aureus*, надана їх біохімічна характеристика, вивчено антиадгезивні властивості та нешкідливість експериментальних антигенних зразків. Восьмигодинна попередня обробка *S. aureus* ATCC 25923 міліметровими хвилями частотного діапазону 61,0 ГГц з подальшою дезінтеграцією за допомогою ультразвуку з частотою 60 кГц надала можливість автору отримати експериментальні зразки безклітинних антигенів (БА), які мали високу антиадгезивну активність.

Розділ 8 присвячено дослідженням отриманих зразків *in vivo*. Всі отримані експериментальні зразки було перевірено на нешкідливість і алергенність в тестах на тваринах та встановлено їх безпечність. Автором також розроблено дві лабораторні моделі: хронічного стафілококового тонзиліту та хронічного назального носійства стафілококового генезу, які дали змогу провести мікробіологічне обґрунтування застосування мікробних антигенів і *Lactobacillus* spp. для санації носіїв золотистого стафілокока. Здобувачем показано, що інтраназальне застосування неін'єкційної форми кандидат-вакцини (комплекс, що містить зразок нативних антигенів *S. aureus* із вмістом білку 1,7 мг/мл (5Ag) і клітини *L. plantarum* IMB B-7679 (оптична щільність 3,0 од. за McFarland) в співвідношенні 1:1) в дозі 0,1 мл тричі на добу протягом 14 діб водночас відновлював мікробіоценоз слизової оболонки носа, стимулював місцеві ланки імунної системи та сприяв повній ерадикації *S. aureus* з носової порожнини лабораторних тварин.

Робота завершується аналізом та узагальненням одержаних результатів, висновками та практичними рекомендаціями, які повністю відображають результати проведених досліджень і є логічним завершенням роботи. В процесі ознайомлення з роботою виникли наступні зауваження:

1) Як пояснити вплив парціального тиску кисню на інгібуючу активність *Lactobacillus* spp. відносно ростових властивостей тест-культур *S. aureus*?

2) Діють лі експериментальні зразки поверхневих антигенів *S. aureus* з високою антиколонізаційною здатністю на інших представників нормальної мікрофлори ВДШ?

3) Будь ласка розкажіть які переваги має ваш новий підхід відносно удосконалення методів профілактики стафілококового бактеріоносійства та перешкодження персистенції стафілококів на слизових оболонках верхніх дихальних шляхів перед іншими відомими напрямками (антибіотики, бактеріофаги, пробіотікопрофілактика, ензимотерапія), присвячених цій же проблемі?

Підсумовуючи викладене вище слід зазначити, що зроблені зауваження стосуються форми викладення матеріалу і ніяк не заперечують новизни і науково-практичної значимості роботи. В порядку наукової дискусії бажано одержати відповіді на наступні **запитання**:

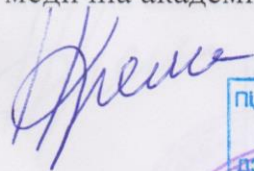
1. На чому базується концепція ефективності розробленого Вами методу (способу) санації стафілококового бактеріоносійства?
2. Чи можливо застосування запропанованих Вами підходів до розробки імунобіологічних препаратів нового покоління із нативними поверхневими мікробними антигенами та пробіотиками, при запобіганні персистенції інших збудників на слизових оболонках ВДШ?

Висновок.

Автореферат дисертаційної роботи оформлено згідно вимог ДАК України, відповідає її змісту та повно висвітлює результати та основні наукові положення дисертаційної роботи. Відповідність напряму досліджень і змісту дисертації галузі науки, формулі спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради. За напрямком досліджень і змістом дисертаційна робота Калініченко Світлани Вікторівни «Мікробіологічне обґрунтування нових підходів до подолання стафілококового носійства за допомогою лактобацил та поверхневих мікробних антигенів», відповідає галузі науки – охорона здоров'я, паспорту (формулі) спеціальності медицина, 03.00.07 –

мікробіологія та профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України». Висновок. Дисертаційна робота Калініченко Світлани Вікторівни «Мікробіологічне обґрунтування нових підходів до подолання стафілококового носійства за допомогою лактобацил та поверхневих мікробних антигенів» є закінченим науковим дослідженням, у якому вирішена важлива наукова проблема – удосконалення методів боротьби зі стафілококовим носійством. Дисертаційна робота Калініченко Світлани Вікторівни за обсягом проведених досліджень, інформативністю використаних методів, актуальністю та методичним рівнем, науковою новизною, теоретичною та практичною значимістю цілком відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженому постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 із змінами та наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. №40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», що висуваються до докторських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія.

Професор кафедри мікробіології,
вірусології, імунології та епідеміології
ДЗ "Дніпропетровська медична академія
МОЗ України",
д.мед.н., професор



Кременчуцький Г. М.

