

ВІДГУК

завідувача кафедри мікробіології, імунології та вірусології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, доктора медичних наук, професора, Філімонової Наталії Ігорівни на дисертаційну роботу Ісаєнко Олени Юріївни «Мікробіологічне обґрунтування нової стратегії розробки та застосування нативних метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* для подолання антибіотикорезистентних збудників бактерійних інфекцій», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 Державної установи «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 дисертаційної роботи

На сьогодні однією з глобальних медичних і соціальних проблем є зростання антибіотикорезистентності. З кожним роком знижується ефективність існуючих антибіотиків, а число резистентних штамів збільшується. Особливу небезпеку становить постійне збільшення бактерій з множинною і розширеною лікарською резистентністю. Згідно даних літератури, інфекційні захворювання, викликані антибіотикорезистентними збудниками, щорічно призводять до 700 000 смертельних випадків, а до 2050 року (при збереженні подібної схильності) припускають 10 мільйонів смертей, що перебільшить нинішній показник в 14,3 разів. В Європі щороку внаслідок нозокоміальних інфекцій, спричинених резистентними штамми, помирає 25 000 осіб. Серед значущих чинників нозокоміальних інфекцій перше місце займає MRSA, від якого щорічно вмирає понад 18 000 чоловік, заражається ж їм в п'ять разів більше (тільки інвазивно, при операціях). Більш того, майже 9 з 10 заражень стійким золотистим стафілококом відбувається в лікарнях, коли пацієнт лікується від іншої хвороби.

Складність боротьби з інфекційними хворобами за участю антибіотикорезистентних мікроорганізмів виникає внаслідок неефективності антибактеріальної терапії: традиційні лікувальні препарати не діють на медикаментозно стійкі бактерії. Додаткові труднощі визиває наявність серед високочутливої популяції мікроорганізмів окремих клітин, які спонтанно набули

стійкість до певного антибіотику. Крім того, за даними деяких джерел вибір антибактеріального препарату в 32,3 % випадків не відповідає сучасним рекомендаціям.

Впровадження нових протимікробних препаратів й досі не вирішило всесвітню проблему розвитку інфекційної патології, особливо викликану антибіотикрезистентними штамми мікроорганізмів. Актуальність проблеми підтверджується неможливістю створення антибіотиків, до яких не буде формуватися звикання та розвиток резистентності у мікроорганізмів. Це обумовлено наявністю у бактерій генів резистентності до майбутніх препаратів, природного й полусинтетичного походження, що встановлено при дослідженні архівних ізолятів.

Актуальність даних досліджень обумовили мету дисертаційної роботи: обґрунтувати нову стратегію розробки та застосування нативних метаболітних комплексів на основі ультразвукових дезінтегратів *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 і *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 для подолання важких запальних процесів, обумовлених антибіотикорезистентними бактеріями в планктонній і біоплівковій формах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота Ісаєнко Олени Юріївни проводилася в межах виконання 2 державних науково-дослідних робіт ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»: «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів» (№ держреєстрації 0116U000864) і «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто- та біфідо- пробіотиків» (№ держреєстрації 0119U100686), що підтверджує актуальність обраного напрямку.

Завершеність дисертаційного дослідження

Для досягнення поставленої мети дисертантом були означені 10 послідовних завдань дисертаційного дослідження: розробити новий спосіб отримання нативних продуктів життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів, їхніх комбінацій, відібрати найбільш активні за протимікробними властивостями

речовини й обґрунтувати перспективність створення метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 при застосуванні, як факторів росту, власних ультразвукових дезінтегратів; визначити біохімічний склад і безпечність у токсикологічних дослідженнях *in vitro* та *in vivo* ультразвукових дезінтегратів та отриманих у них метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745; дослідити вплив речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 на гемолітичну, лецитовітелазну активності, продукування пігментів (піоціанін, піовердин, піорубін) умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів; охарактеризувати антибактеріальні властивості фільтратів ультразвукових дезінтегратів і метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 відносно референтних, патогенних, умовно-патогенних бактерій, включаючи антибіотикорезистентні ізоляти; вивчити вплив метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 на адгезію бактеріальних клітин еталонного штаму *S. aureus* ATCC 6538 P (209-P) при його обробці дослідними речовинами або еритроцитів людини метаболітами; біоплівкоутворення й попередньо сформовані 24-годинні біоплівки окремими представниками референтних, патогенних, антибіотикорезистентних умовно-патогенних мікроорганізмів; розробити оригінальний спосіб отримання нативних метаболітів завдяки вирощуванню продуцентів (*S. boulardii* CNCM I-745) в ультразвукових дезінтегратах інших пробіотиків (зокрема *L. rhamnosus* GG ATCC 53103) для підвищення протимікробних, антиадгезивних, протибіоплівкових властивостей; порівняти мінімальні інгібуючі та бактерицидні концентрації метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 відносно планктонних і біоплівкових форм бактерій; вивчити *in vitro* комбіновану активність речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибактеріальними препаратами відносно патогенних *Corynebacterium* spp. та антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій при одночасному та послідовному їхньому застосуванні; в експериментах *in vivo* дослідити протимікробні властивості при окремому лікувальному і профілактично-лікувальному застосуванні метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103

і *S. boulardii* CNCM I-745 щодо ран, інфікованих антибіотикорезистентним збудником *P. aeruginosa* PR № 0924; на моделях ран лабораторних тварин, інфікованих антибіотикорезистентним збудником *P. aeruginosa* PR № 35, оцінити ефективність комбінованого застосування біологічно активних речовин лактобактерій і сахароміцетів з амікацином.

Як свідчать матеріали дисертаційної роботи, здобувачем виконано всі поставлені задачі: проведено системний аналіз профільної медичної документації і тематичної наукової літератури, у роботі використано сучасні і адекватні поставленим завданням методи дослідження (бактеріологічні, мікроскопічні, фізичні, фізико-хімічні, біохімічні, біологічні, токсикологічні, аналітичні та медико-статистичні). Експериментальні дослідження проведено у достатньому обсязі з повноцінною статистичною обробкою їх результатів. Достовірність одержаних результатів обумовлено застосуванням у роботі адекватних статистичних методів.

Наукові положення і висновки дисертаційної роботи Ісаєнко О. Ю. ґрунтуються на даних експериментів, статистичної обробки та аналітичного узагальнення їх результатів, логічно відображають її зміст та завершеність.

Аналіз наявності академічного плагіату та використання результатів раніше захищеної здобувачем кандидатської дисертації

За результатами рецензування матеріалів дисертаційної роботи «Мікробіологічне обґрунтування нової стратегії розробки та застосування нативних метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* для подолання антибіотикорезистентних збудників бактерійних інфекцій» не виявлено ознак наявності академічного плагіату. Більшість результатів досліджень, на основі яких сформульовано основні наукові положення, висновки і рекомендації докторської дисертації Ісаєнко О. Ю. є пріоритетними.

Наукові положення і результати, що виносяться на захист здобувачем наукового ступеня доктора медичних наук у його докторській дисертації, не виносилися на захист у кандидатській дисертації «Біологічна характеристика антигенів *B. pertussis*, виділених за допомогою ультразвукової дезінтеграції», ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»,

Харків, 2010.

Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Сформульовані в дисертаційній роботі Ісаєнко О. Ю. основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації ґрунтуються на великій кількості експериментів. Вдале планування усіх етапів роботи, вибору методичних підходів та об'єму досліджень, що відповідають до поставленої мети, обумовили отримання обґрунтованих і достовірних даних, а на їх підставі – формулювання основних положень дисертаційного дослідження.

Дисертант у роботі використала комплекс сучасних бактеріологічних, мікроскопічних, фізичних та фізико-хімічних, біохімічних, біологічних, аналітичних та математико-статистичних методів досліджень, що дозволило отримати результати, які відповідають високому науковому і методичному рівню. Достатній обсяг досліджень зі статистичним опрацюванням кожного етапу роботи цілком відповідають сучасним стандартам доказової медицини. Усі етапи запланованих досліджень адекватні та достатні за об'ємом для отримання достовірних даних. Наведені висновки логічно витікають з отриманих результатів досліджень, повністю належать дисертантові, як підсумок і узагальнення власних досліджень. Практичні рекомендації зроблені професійно і надають подальші перспективи досліджень у означеному науковому напрямку та їх можливе використання для практичної медицини.

Вірогідність і наукова новизна наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Сформульовані Ісаєнко О. Ю. основні наукові положення і висновки базуються на результатах дослідження, що були отримані в результаті використання сучасних інформативних методів досліджень і є відповідними до поставлених завдань наукової роботи.

Дисертантом вперше обґрунтовано перспективність розробки та методи оптимального застосування нативних метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 і *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (як основна діюча речовина) та в комбінації з антибіотиками (як додатковий препарат) з метою

створення засобів подолання важких запальних процесів, обумовлених антибіотикорезистентними бактеріями в планктонній і біоплівковій формах.

У роботі вперше запропоновано на основі ультразвукових дезінтегратів пробіотичних мікроорганізмів отримання нативних високоактивних речовин *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 та *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 проти планктонних і біоплівкових форм патогенних та антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій, які в низьких концентраціях (від $\leq 0,02$ мг / мл) мають бактерицидний ефект відносно обох форм збудників бактерійних інфекцій.

Здобувачем вперше показана можливість застосовувати ультразвукові дезінтеграти для культивування не лише власних, а й інших продуцентів пробіотичних мікроорганізмів, зокрема грибів і бактерій. Обґрунтовано доцільність і адаптовано технічні етапи одержання комбінації метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 для посилення протимікробної дії кінцевого продукту проти патогенних бактерій, в 2,4 раза, внаслідок спільного вирощування пробіотичних сахароміцетів і лактобактерій в ультразвукових дезінтегратах пробіотиків. Одержано нові дані щодо пригнічення гемолітичної, лецитовітелазної активностей, накопичення пігментів (піоціаніну, піовердину, піорубіну) патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів біологічно активними речовинами *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745.

Показано, що протимікробний комплекс *S. boulardii* CNCM I-745 і *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, який містить клітинні структури лактобактерій і метаболіти сахароміцетів, має більш виражені антиадгезивні (*S. aureus* ATCC 6538 P) й протибіоплівкові (*C. diphtheriae gravis* tox + № 108, *C. ulcerans* tox+ № 112, *P. aeruginosa* ATCC 27853) властивості.

У роботі вперше доведено здатність метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745, отриманих за авторськими способами, підвищувати чутливість патогенних і антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій до антибактеріальних препаратів *in vitro*.

Вперше запропоновано застосування послідовного використання нативних метаболітних комплексів і комбінацій *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii*

CNCM I-745 з антибактеріальними препаратами *in vitro*. Експериментально доведено перевагу зазначеного способу порівняно з окремим випробуванням антибіотику або комбінованим одночасним їхнім впливом.

Дисертантом підтверджено в експериментах *in vivo* на моделі ран мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним збудником *P. aeruginosa* PR № 0924, протимікробну активність метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, отриманого культивуванням продуцентів в ультразвукових дезінтегратах пробіотиків.

Здобувачем одержано нові дані *in vivo* на моделі ран шкіри мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 35, щодо ефективності одночасного та послідовного застосування комбінації *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з амікацином, яке сприяє швидшій ерадикації збудника, що в подальшому може бути включено в програму лікування гнійно-запальних хвороб.

Практичне значення отриманих результатів

Дисертантом, на основі ультразвукових дезінтегратів пробіотичних мікроорганізмів *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 і *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, отримано метаболітні комплекси з вираженими поліфункціональними властивостями, які стали підґрунтям нової стратегії розробки нативних речовин. Запропоновані автором методи захищено двома патентами на корисну модель: патенти України № 123122 і № 126603. Розроблено і впроваджено у медичну практику галузеві нововведення: «Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій», «Спосіб одержання комбінації метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій». Обґрунтовані способи запропоновано для впровадження на виробничі підприємства, для розробки на їх основі ряду антимікробних засобів, комплексне використання яких, спільно зі стандартними схемами терапії, здатне суттєво покращити результативність лікування пацієнтів з інфекційними хворобами, спричиненими антибіотикорезистентними мікроорганізмами. Отримані метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745, які не потребують додаткової очистки і модифікації, рекомендовано для доклінічних випробувань і подальшого введення в практичну медицину для запобігання

розвитку нозокоміальних і хронічних інфекційних процесів у людини. Запропонована нова стратегія оптимального послідовного використання метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибіотиками для терапії інфекційних хвороб різного генезу та етіології, у тому числі викликаних антибіотикорезистентними бактеріями.

Основні матеріали й положення дисертаційної роботи Ісаєнко О. Ю. впроваджено в навчальний процес і наукову роботу кафедри молекулярної та медичної біофізики ХНУ ім. В. О. Каразіна (3 акта впровадження від 27.12.2017 р., 22.01.2019 р. та 20.01.2020 р), кафедри технології переробки, стандартизації та технічного сервісу Харківської державної зооветеринарної академії (3 акта впровадження від 21.01.2020 р., 17.03.2020 р. та 08. 09.2020 р.), кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету (акт впровадження від 29.05.20 р.), кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «Харківський політехнічний інститут» (акт впровадження від 10.12.20 р.).

Повнота викладу наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації. Основні наукові положення, висновки й отримані результати повною мірою освітлені в 35 наукових працях, серед них 2 зарубіжні колективні монографії, 20 статей у наукових фахових виданнях (2 – у міжнародній наукометричній базі Scopus (Q3), 9 – у міжнародній наукометричній базі Web of Science, 9 включено до інших міжнародних наукометричних баз), 2 патенти України на корисну модель, 2 галузевих нововведення у сфері охорони здоров'я, 9 тез у збірниках міжнародних конференцій.

Відповідність оформлення дисертації вимогам пункту 10 “Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 із змінами та наказу Міністерства освіти і науки від 12.01.2017 р. № 40 “Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій”

Дисертаційна робота Ісаєнко О. Ю. «Мікробіологічне обґрунтування нової стратегії розробки та застосування нативних метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* для подолання антибіотикорезистентних

збудників бактерійних інфекцій» викладена українською мовою на 379 сторінках друкованого тексту, містить вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, дев'ять розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки та практичні рекомендації, список використаних першоджерел (481 посилання). Робота містить 43 таблиці, 48 рисунків, 5 додатків.

У вступі автор формулює актуальність обраної наукової проблеми, обґрунтовує доцільність досліджень. У розділі наведено наочний зв'язок роботи з науковими темами ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України». Вичерпно та зрозуміло розкрито наукову новизну й практичне значення дисертаційної роботи.

В огляді літератури наведено світові дані щодо проблем стрімкого набуття та розповсюдження антибіотикорезистентності у бактерій і біоплівкових форм збудників бактерійних хвороб; обґрунтовано необхідність підвищення ефективності антимікробної терапії інфекційних хвороб, спричинених зазначеними бактеріями; висвітлено перспективність розробки протимікробних препаратів на основі похідних і метаболітів пробіотичних штамів мікроорганізмів, серед останніх надано перевагу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*; показано відомі методи отримання продуцентів і метаболітів пробіотиків та теоретично обґрунтовано їх недоліки; проаналізовано сучасні дані окремого й спільного з антибактеріальними препаратами застосування метаболітів пробіотичних штамів мікроорганізмів; наведено узагальнюючі аргументи щодо необхідності створення нових препаратів метаболітного типу та визначення більш ефективних шляхів їхнього використання в антимікробній терапії сучасних інфекційних хвороб.

У першому розділі власних досліджень приводяться дані щодо способів отримання нативних метаболітних комплексів з високими протимікробними властивостями, які не потребують додаткової очистки і модифікації. Визначено антибактеріальні властивості різних метаболітних комплексів пробіотичних мікроорганізмів. Найбільш високоактивними метаболітними комплексами від різних пробіотиків *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *E. faecium*, *S. boulardii* є продукти життєдіяльності *L. rhamnosus* GG ATCC 53103. При визначенні рівня

антимікробної активності встановлена залежність проявів бактерицидної здатності тест-зразків від початкової концентрації клітин: більш високі концентрації призводять до більш виражених рівней активності. Визначено, що умовно-патогенні збудники виявилися більш чутливими до метаболітних комплексів лактобактерій і сахароміцетів, отриманих вирощуванням продуцентів у власних клітинних структурах, порівняно з метаболітами, одержаними культивуванням продуцентів у поживному бульйоні з додаванням 1 % глюкози.

У другому розділі власних досліджень доведені переваги нового способу одержання комбінації метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 шляхом спільного культивування сахароміцетів і лактобактерій в ультразвукових дезінтегратах пробіотиків, який призводив до посилення антибактеріальної дії проти патогенних коринебактерій, в 2,4 раза, порівняно з метаболітним комплексом *L. rhamnosus* GG. При визначенні рівня прояву протимікробного ефекту доведена залежність від тривалості експозиції, концентрації та активності метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745.

Проведено визначення впливу метаболітних комплексів на фактори патогенності, за результатами якого виявлено, що найбільша інгібуюча дія щодо продукування пігментів та гемолітичної активності *P. aeruginosa* відбувалася під впливом ML, а пригнічення гемолітичної, лецитовітелазної активностей та втрата характерного пігменту *S. aureus* № 7 – гемоліз / лецитиназа, *S. haemoliticus* і *C. d. mitis tox* +№ 167 – гемоліз встановлена після двогодинного впливу речовин *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*.

В роботі зазначено, що оптимальними умовами зберігання метаболітних комплексів та строком витримки дослідних речовин із збереженням їхніх властивостей є зберігання в замороженому стані при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ впродовж 6 місяців (термін спостереження).

У третьому розділі власних досліджень представлені результати вивчення антиадгезивних, протибіоплівкових властивостей фільтратів *L. rhamnosus* GG та *S. boulardii*, які показали виражену протибіоплівкову дію дослідних речовин, як відносно процесу біоплівкоутворення умовно-патогенними збудниками, так і щодо

попередньо сформованих ними біоплівок. Найбільш виражену протибіоплівкову дію відносно біоплівкоутворення патогенних коринебактерій проявила комбінація метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745. Показано, що вираженість ефекту відносно біоплівкових форм антибіотикорезистентних бактерій залежить від активності продуктів метаболізму лактобактерій і сахароміцетів та індивідуальної чутливості збудників. А також: чим вище протимікробний потенціал дослідних речовин, тим протибіоплівкова активність фільтратів менше залежить від рівню сформованих біоплівок мікроорганізмів.

У четвертому розділі власних досліджень представлено вивчення безпечності та складу фільтратів ультразвукових дезінтегратів і метаболітних комплексів. Проведене всебічне токсикологічне дослідження отриманих речовин при різних шляхах введення лабораторним тваринам (внутрішньошлунковому, внутрішньоочеревинному), однократному топічному нанесенні, на ушкоджену поверхню тіла, на слизові оболонки. Встановлено, що за рівнями вираженості токсичних властивостей усі похідні та метаболіти пробіотичних штамів мікроорганізмів відносяться до безпечних речовин. Детальний біохімічний аналіз клітинних структур та метаболітних комплексів показав наявність білків, зокрема пептидів, амінокислотів, молочної кислоти, вуглеводів, ліпідів, тейхоевих кислот, мінеральних речовин. Представлена порівняльна характеристика їхніх складових.

У п'ятому розділі власних досліджень встановлено мінімальні інгібуючі концентрації для антибіотикорезистентних бактерій в планктонних і біоплівкових формах, а також референтних штамів мікроорганізмів. Доведено, що використання в якості живильних середовищ ультразвукових дезінтегратів дозволяє одержати біологічно активні речовини з різних пробіотиків бактерій і грибів з вираженим протимікробним ефектом: мінімальна інгібуюча концентрація фільтратів ML для референтних штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 становила 0,27 мг / мл білку, а MLS – 0,21 мг / мл білку. Найменші випробувані концентрації ML (0,03 мг / мл білку) та MLS (0,02 мг / мл білку) визивали зниження оптичної щільності штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 77,16 – 82,3 %, 51,25 – 52,78%, 31,43 – 31,58

%.

При порівнянні рівней активності дослідних речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 підтверджена здатність до інгібіції планктонних та біоплівочних форм різних антибіотикорезистентних мікроорганізмів. Тест-зразки речовин ML / MLS (в невеликих концентраціях) виявляють високий рівень протимікробної та протибіоплівкової активностей.

У шостому розділі власних досліджень надані результати комбінованого впливу метаболітних комплексів з антибактеріальними препаратами в тестах *in vitro*. Встановлено, що одночасне застосування метаболітних комплексів пробіотичних мікроорганізмів спільно з різними антибіотиками здатне підвищувати протимікробний ефект. Однак, у порівнянні з послідовним застосуванням (попередня преінкубація мікроорганізмів у фільтратах пробіотиків) дещо поступався у рівнях антимікробних властивостей речовин та антибіотиків. В роботі зазначено ефективність низькотемпературного зберігання дослідних речовин при температурі $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$, яке не спричиняє зниження антибактеріальної активності дослідних речовин при комбінованому їхньому застосуванні з антибіотиками.

У сьомому розділі власних досліджень обґрунтовано перспективність використання метаболітних комплексів лактобактерій і сахароміцетів для конструювання поліфункціональних протимікробних препаратів на основі отриманих результатів щодо посилення ефекту при комбінованому послідовному використанні дослідних проб з антибактеріальними препаратами у 73 % – 88 % комбінацій відносно різних антибіотикорезистентних умовно-патогенних та патогенних бактерій. Запропонований послідовний метод використання, який передбачає спочатку вплив метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 5310 і *S. boulardii* CNCM I-745 потім антибіотиків, дозволяє створювати велику кількість варіантів, які посилюють спільну антибактеріальну активність компонентів. Збільшення зон затримки росту мікроорганізмів відбувалося з різними антибіотиками, деякі мікроорганізми переходили із категорії «резистентний» або «помірно стійкий» в категорію «чутливий». Такі протимікробні комбінації можна з ефективною застосовувати задля антибактеріальної терапії бактерійних інфекцій.

У восьмому розділі власних досліджень автором показана більша поєднана протимікробна дія метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 5310 і *S. boulardii* CNCM I-745 з бактерицидними і бактеріостатичними концентраціями антибіотиків. Комбіноване застосування дослідних речовин, навіть з певними субтерапевтичними концентраціями антибіотиків, в більшій мірі інгібує антибіотикорезистентні збудники, порівняно з окремим впливом антибактеріальних препаратів.

У дев'ятому розділі власних досліджень На моделі ран шкіри мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 35, визначена ефективність одночасного та послідовного застосування MLS (~ 0,8 мг/кг за вмістом білка на тварину) з амікацином.

При визначенні хіміотерапевтичної ефективності новітніх тест-зразків при відтворенні експериментальної інфекції, яка викликана *P. aeruginosa* PR № 35, встановлено, що найбільший результат був зареєстрований в групі з поступовим застосуванням речовин, та перевищував у порівнянні з одночасним застосуванням в 1,8 та 5,0 разів відповідно дані загальних площ поверхонь ран на 5 та 8 добу.

Визначена суттєва значущість створення нових антибактеріальних препаратів особливо у відношенні пріоритетних збудників хвороб, серед яких *P. aeruginosa*, яка відноситься до першої категорії пріоритетності: критично високий рівень.

Рекомендовано, що в якості ефективних способів лікування, можливо застосовувати нативні метаболітні комплекси пробіотичних мікроорганізмів у послідовному комбінуванні з антибіотиками, за рахунок пригнічення факторів патогенності та підвищення чутливості бактерій, що сприятиме підвищенню ефективності при лікуванні і профілактики захворювань різного генезу.

Кожний розділ роботи закінчується узагальненням результатів досліджень, які є достовірними, містять нові наукові дані, достатньо обґрунтовані, виконані на високому методичному рівні, статистично опрацьовані за допомогою сучасних комп'ютерних програм, викладені послідовно, що демонструє вміння дисертанта аналізувати матеріал, та завершуються висновками.

Висновки логічно витікають з матеріалів дисертації, повністю відображають теоретичні, експериментальні, статистичні етапи представлених досліджень. У них

відображено сумарні результати роботи.

Список використаних джерел містить 481 посилання й оформлений відповідно до ДСТУ 8302:2015 «Інформація та документація. Бібліографічне посилання. Загальні положення та правила складання».

У додатках представлено «Список публікацій здобувача», «Відомості про апробацію результатів дисертації», копії двох патентів, вісім актів впровадження, диплом-відзнака Президії Національної академії медичних наук України науково-дослідної роботи «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів», як кращої, що була виконана у 2018 році, відповідальним виконавцем якої була дисертант.

Разом із загальною позитивною оцінкою роботи необхідно зробити наступні зауваження:

1. В процесі рецензування роботи дисертанту були зроблені зауваження щодо спрощення графічного матеріалу, зокрема рисунків, таблиць, що було усунуто під час оформлення дисертації.
2. Розділ «Матеріали і методи дослідження» мав детальний опис загальновідомих методів, на що було звернуто увагу й скорочено у процесі оформлення дисертаційної роботи шляхом надання на них посилань.

Оцінюючи в цілому роботу позитивно, хотілося б у порядку уточнення окремих положень одержати відповіді на наступні питання:

1. Чи використовувався дезінтеграційний метод обробки пробіотичних культур у вищевказаному напрямку в дослідженнях інших науковців, чи він був застосований Вами вперше?
2. Як можна пояснити вищу протимікробну, протибіоплівкову активність метаболітних комплексів лактобактерій перед аналогічними речовинами сахароміцетів?
3. Чому на моделях ран лабораторних тварин, інфікованих антибіотикорезистентним збудником *P. aeruginosa*, для оцінки ефективності комбінованого застосування біологічно активних речовин лактобактерій і сахароміцетів, обрано амікацин?

Відповідність напрямку досліджень і змісту дисертації галузі науки, формулі спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради

Напрямок і зміст дисертаційної роботи на тему: «Мікробіологічне обґрунтування нової стратегії розробки та застосування нативних метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* для подолання антибіотикорезистентних збудників бактерійних інфекцій» повністю відповідає галузі науки – охорона здоров'я, паспорту (формулі) спеціальності 222 – 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 Ісаєнко Олени Юріївни «Мікробіологічне обґрунтування нової стратегії розробки та застосування нативних метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* для подолання антибіотикорезистентних збудників бактерійних інфекцій» є актуальним, виконаним на сучасному рівні, що містить нові результати та узагальнення, закінченим науковим дослідженням, у якому вирішена важлива наукова проблема – розширення спектру лікувально-профілактичних препаратів метаболітного типу та запропонування нативних немодифікованих високоактивних речовин з багатоспрямованою дією, зокрема проти грамнегативних антибіотикорезистентних бактерій в планктонній та біоплівковій формах, шляхом розробки та використання нових високоактивних нативних метаболітичних комплексів на основі ультразвукових дезінтегратів *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 і *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 з поліфункціональними властивостями, зокрема протимікробними, антиадгезивними, протибіоплівковими, а також комбінованою активністю з антибіотиками, для подолання важких запальних процесів.

За актуальністю, методичним рівнем, новизною і практичною значущістю отриманих результатів дисертація відповідає вимогам пунктів 9, 10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. із змінами і Наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», які

висуваються до докторських дисертацій, а Ісаєнко Олена Юріївна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук зі спеціальності 03.00.07 – мікробіологія.

Завідувач кафедри мікробіології, імунології
та вірусології Національного
фармацевтичного університету МОЗ України
доктор медичних наук, професор



Н. І.Філімонова

Підпис професора Філімонової Н. І. засвідчую
Провідний фахівець
з питань кадрової роботи:



Купіна О. В.