

ВІДГУК

офіційного опонента завідувача кафедри мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України, доктора медичних наук, професора Климнюка Сергія Івановича на дисертаційну роботу Грузевського Олександра Анатолійовича «Вплив місцевих факторів колонізаційної резистентності, імунного статусу та стану нейрогормональної регуляції на розвиток та прогресування бактеріального вагінозу», 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 дослідження. Вагінальна екосистема характеризується поліморфною ендogenous мікрофлорою, при зміні якої виникає ризик розвитку поширених інфекцій нижнього відділу статевого тракту. Бактеріальний вагіноз (амінокольпит / анаеробний вагіноз) – незапальний синдром, пов'язаний з дисбіозом біотопу піхви. Він характеризується надмірно високою його колонізацією мікроорганізмами різних видів, тому створює актуальну наукову та медичну проблему. В амбулаторній гінекологічній практиці бактеріальний вагіноз діагностують у 15-19% пацієнток, серед вагітних жінок він зустрічається в 10-30% спостережень, у жінок із запальними захворюваннями малого тазу в 35%. Але визначити справжню частоту стрічання бактеріального вагінозу не представляється можливим у зв'язку з тим, що він статистично не реєструється, і тому, що у 1/2 жінок це захворювання має безсимптомний перебіг.

Дисертаційне дослідження Грузевського Олександра Анатолійовича «Вплив місцевих факторів колонізаційної резистентності, імунного

статусу та стану нейрогормональної регуляції на розвиток та прогресування бактеріального вагінозу» присвячена розв'язанню важливої наукової проблеми – підвищення ефективності прогнозування та діагностики бактеріальних дисбіозів. Бактеріальний вагіноз (амінокольпит / анаеробний вагіноз) – незапальний синдром, пов'язаний з дисбіозом біотопу піхви, характеризується надмірно високою його колонізацією практично створює актуальну наукову та медичну проблему. Факультативно-анаеробні та облігатно-анаеробні опортуністичні мікроорганізми, які представляють резидентну мікробіоту уrogenітального тракту, під дією багатьох екзо- та ендогенних факторів можуть проявляти свій патогенний потенціал, сприяючи формуванню інфекційно-запального процесу. В асоціаціях вірулентність мікроорганізмів посилюється, але визначити, який саме з них на даній стадії започатковує запальний процес, відіграючи провідну роль, практично неможливо, тому що специфічні клінічні симптоми захворювання практично відсутні. Зміни складу мікробіоценозу піхви клінічно можуть проявлятися різними нозологічними формами захворювань: бактеріальним вагінозом, вагінітом і вагінальним кандидіазом. Але бактеріальний вагіноз є найпоширенішим видом інфекційної патології жіночих статевих органів переважно у репродуктивному віці. Він розглядається як полімікробний вагінальний синдром і проявляється не тільки вагінальними виділеннями, появою зуду, але й ураженням шийки матки, тіла матки, її придатків, тому може бути безпосередньою причиною патології вагітності та пологів. Етіологічна структура збудників інфекційних процесів у жінок протягом останніх десятиліть істотно змінилася, що пов'язано з постійною еволюцією бактерій і включенням до розвитку патологічних процесів опортуністичних мікроорганізмів. Хронічні запальні процеси внутрішніх статевих органів у жіно, без сумніву, слід розглядати як мультисистемне

захворювання, що супроводжується включенням до розвитку патологічного процесу практично всіх ланок нейроендокринної, центральної і вегетативної нервової, серцево-судинної, сечовидільної, імунної систем, регуляції гомеостазу та обміну речовин. Це в свою чергу супроводжується розладом специфічних функцій жіночого організму, зокрема, менструальної, статевої, репродуктивної, виникненням синдрому тазових болів і в решті решт генералізацією процесу. На появу таких зрушень насамперед впливають фактори, які забезпечують колонізаційну резистентність організму та систему вродженого та набутого імунітету. Тому визначення та оцінка виявлених порушень, локальних факторів, які забезпечують підтримання колонізаційної резистентності, імунного статусу людини, а нейрогормональної регуляції щодо мікробіоценозу піхви сприятиме підвищенню ефективності діагностики та прогнозування розвитку бактеріального вагінозу та інших запальних процесів жіночих статевих органів дозволяє оцінити обрану тему дисертаційної роботи як надзвичайно актуально.

Зв'язок теми дисертації з науковими темами, планами, програмами Дисертаційна робота Грузевського О.А. виконана на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Одеського національного медичного університету і є фрагментом науково-дослідної роботи «Мультиплексне визначення впливу загальних та місцевих регулюючих факторів на мікробіоценоз піхви» (№ державної реєстрації 0115U006643), в якій дисертант був керівником. Тема і план дисертації затверджені Вченою радою Одеського Національного медичного університету МОЗ України (протокол № 7 від 14.04.2016 р.).

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень, висновків і рекомендацій, їх достовірність і новизна. Для досягнення поставленої мети – підвищення ефективності діагностики та прогнозування розвитку бактеріального вагінозу шляхом визначення

впливу нейрогормональної регуляції, імунного статусу та місцевих акторів колонізаційної резистентності на біоценоз піхви були визначено певні завдання. Результати роботи базуються на достатньо репрезентативній кількості експериментальних досліджень, клінічних спостережень. Автором проведено всебічне клініко-лабораторне обстеження майже 300 хворих жінок, які звернулися до гінеколога з приводу профілактичного огляду, прегравідарної підготовки, або наявності певних симптомів і, відповідно, скарг. Для реалізації поставлених завдань автор використав комплекс сучасних адекватних високоінформативних методів дослідження – бібліосемантичних, загально-клінічних, мікроскопічних, фізико-хімічних; імунологічних; імунобіологічних; молекулярно-генетичних; аналітичних і медико-статистичних, саме на останній апарат слід звернути увагу. Він посідає надзвичайно важливу при аналізі результатів дослідження

Таким чином, слід визнати, що достатній обсяг проведених спостережень та експериментів, адекватна статистична обробка результатів дозволяє підтвердити достовірність зроблених автором висновків, які відповідають меті та поставленим завданням.

Наукова новизна. На регіональному рівні вперше визначено та конкретизовано якісні та кількісні особливості нормоценозу порівняно з бактеріальним дисбіозом. Показано, що за відсутності ознак інфекційно-запального процесу при індексі умовно патогенних мікроорганізмів (ІУПМ) ≤ -3 Іg ГЕ/зразок у жінок спостерігався нормоценоз із переважанням серед факультативно анаеробної флори представників родини *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium* spp.; серед облигатно анаеробної – *Mobiluncus* spp. та *Eubacterium* spp. При дисбіозі I ступеня (ІУПМ від -3 Іg ГЕ/зразок до -1 Іg ГЕ/зразок) спостерігалось зниження загальної бактеріальної маси і кількості лактобактерій на тлі збільшення частоти виявлення та рівня *Corynebacterium* spp., анаеробів, серед яких

переважали *Mobiluncus* spp. та *Eubacterium* spp. При різних степенях з'являлися представники видів *Sneathia* spp., *Leptotrihia* spp., *Fusobacterium* spp. і *Mycoplasma hominis* чи *Mycoplasma genitalium*. При дисбіозі II ступеня (ІУПМ>-1 Іg ГЕ/зразок) загальна бактеріальна маса (ЗБМ) знижувалася на 12,5 % порівняно з нормоценозом та на 10,9 % – порівняно з дисбіозом I ступеня. Кількість лактобактерій була меншою на 35,1 % порівняно з нормоценозом і на 29,4 % – з дисбіозом I ступеня. Серед факультативних анаеробів суттєво домінували *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp. і *Staphylococcus* spp. перевищуючи нормальні показники. Практично всі види облигатних анаеробів колонізували слизові, на декілька порядків вище, ніж при нормі, при чому роди бактерій *Sneathia*, *Leptotrihia*, *Fusobacterium* spp., при нормоценозі взагалі не виявлялися. У той же час у патологічному мікробіоценозі з'являлися нехарактерні для нормоценозу мікоплазми. Вперше доведено, що гуморальна ланка, яка забезпечує місцеву колонізаційну резистентність активувалась при дисбіозі I ступеня та пригнічувалася на тлі бактеріального вагінозу, коли вкрай низькі рівні секреторного ІgА та лізоциму у вагінальному секреті засвідчували наявність глибокого локального імунодефіциту. Різке зниження фагоцитарної активності ФАЛ, лімфоцитів, індексу ФАЛ, вмісту імунних комплексів та компонентів комплементу С3 і С4 при бактеріальному вагінозі вказувало на розвиток комбінованого локального імунодефіциту. Вперше показані закономірності функціонування імунної системи при бактеріальному вагінозі. При дисбіозі, аж до бактеріального вагінозу, на тлі загального лімфоцитозу спостерігалось поступове зменшення у крові вмісту CD3- та CD4-лімфоцитів, що підтверджувало прогресування Т-клітинного імунодефіциту. Була виявлена залежність ступеня прогресування дисбіозу від активації НК-клітин (CD16) та В-лімфоцитів (CD22). За умов наростання тяжкості дисбіозу відмічено формування недостатньої

фагоцитарної активності особливо при бактеріальному вагінозі. Було доведено, що рівень певних цитокінів у крові збільшувався з поглибленням ступеня дисбіозу. Загальний аналіз зв'язку показників імунної системи у крові виявив розвиток системного комбінованого імунодефіциту та вихід найпатогенніших мікроорганізмів з-під контролю імунної системи. Вперше охарактеризовані порушення нейрогормональної регуляції при цій хворобі, доведено, що рівні кортизолу, фолікулостимулюючого гормону та естрадіолу у крові віддзеркалювали ступінь дисбіозу. Одержано нові дані щодо взаємовпливу стану мікробіоценозу, місцевої колонізаційної резистентності, імунної системи та системи нейрогормональної регуляції, які відображали виникнення єдиної регуляторної патологічної гормонально-імунної системи, що сприяє розвитку вагінального дисбіозу

Наукова новизна дослідження підтверджена патентом на корисну модель «Спосіб визначення ступеня впливу місцевих факторів колонізаційної резистентності на біоценоз піхви» та 2 інформаційними листами, а саме: «Використання імунорегуляторного індексу для покращення діагностики вагінального дисбіозу та бактеріального вагінозу» та «Використання нейромережових моделей для прогнозування ризику розвитку дисбіозу за показником нормобіоти».

Практичне значення дисертаційної роботи О.А. Грузевського полягає в тому, що розроблений та захищений патентом спосіб визначення ступеня впливу місцеві факторів колонізаційної резистентності на біоценоз піхви, який є основою розробки нового підходу до діагностики вагінальних дисбіозів. Результати досліджень дозволили створити чітку характеристику нормоценозу, обґрунтовують доцільність застосування запропонованих параметрів для діагностики бактеріальних дисбіозів, що, у свою чергу, прокладає шлях до поліпшення їх лікувальної корекції дисбіозів.

Побудовано логістичної моделі регресії за показником нормобіоти та індексом умовно-патогенних мікроорганізмів, які показали що ризик розвитку дисбіозу за ПНБ статистично значуще підвищується при зростанні в крові рівнів mIL2, TNF α , а за критерієм індексу умовно-патогенних мікроорганізмів ІУПМ - статистично достовірно знижується при збільшенні рівня IL10 у вагінальному секреті та при прирості вмісту у IL4 крові.

Розроблені лінійні нейромережеві моделі для визначення ступеня тяжкості дисбіозу за показником нормобіоти, до якої увійшли рівні C4 комплементу та γ -INF вагінальному секреті, а також вміст у крові циркулюючих імунних комплексів та TNF α та за індексом умовно-патогенної мікрофлори –рівні секреторного IgA, лізоциму, γ -INF і TGF1 β у вагінальному секреті, а також вміст C4у компоненту комплемент та IL8 у крові.

Створено інтерфейси експертних систем прогнозування ступеня тяжкості дисбіозу за показником нормобіоти та індексом індексом умовно-патогенних мікроорганізмів , що дає змогу прогнозувати ризики розвитку вагінальних дисбіозів з високим ступенем вірогідності і, отже, коригувати діагностичний і, в подальшому лікувальний процес.

Основні матеріали і положення дисертаційної роботи впроваджено в науковий і навчальний процес на кафедрах мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України, Української медичної стоматологічної академії МОЗ України, Вінницького Національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України, на кафедрі мікробіології та вірусології Буковинського державного медичного університету, а також у клініко-діагностичний процес ДУ «Науково-дослідний протичумний інститут імені І.І. Мечникова МОЗ України, ДП «Український Науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України».

Повнота висвітлення результатів дисертаційного дослідження в опублікованих працях (наукових фахових виданнях) та авторефераті. Основні наукові положення, висновки й отримані результати повною мірою висвітлені в 48 наукових працях (26 одноосібних), з них у 26 статтях у наукових фахових виданнях України, що входять до міжнародних наукометричних баз даних, 10 – в іноземних фахових наукових журналах, отримано один патент України на корисну модель, підготовано 2 інформаційних листи, опубліковано представлено 19 тез в матеріалах міжнародних та Українських науково-практичних конференціях, з'їздах, конгресах симпозиумах, 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 і викладена на 340 сторінках друкованого тексту, Вона складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, семи розділів власних досліджень, глави, присвяченій аналізу та узагальненню результатів, висновків і рекомендації, списку використаних джерел літератури з 296 посиланнями. Робота містить 50 таблиць 47 рисунків і 4-ри додатки.

У вступі обґрунтовується актуальність теми дослідження. У ньому чітко і лаконічно визначено мету, та окреслюється шлях її реалізації у вигляді 9 завдань. Вони сформульовані коректно, правильно, а їх

виконання, дозволяє досягти мети. Вичерпно викладено наукову новизну і практичну значущість роботи, відмічено особистий внесок автора у виконання досліджень.

У розділі «Огляд літератури» узагальнено сучасні уявлення щодо проблеми формування бактеріальних вагінозів, підкреслено роль окремих представників мікробіоти людини за умов нормоценозу та дисбіозу. Відмічено значення бактеріального вагінозу як можливої причини виникнення ускладнень вагітності та пологів. Автор зауважив, що за наявності довготривалих та рясних виділень з піхви у жінок можливий розвиток ще й психосоматичних порушень, знижується працездатність, ламається статева і дітородна функції, та як результат погіршується якість життя. У розділі проаналізовано інформацію про стан імунної системи та неспецифічних факторів захисту у жінок з бактеріальним вагінозом. Представлено огляд сучасних діагностичних підходів до розв'язання проблеми вагінальних дисбіозів та зосереджено увагу на перспективах розробки нових діагностичних засобів та способів його подолання. Огляд написано, чітко логічно із знанням матеріалу

У розділі «Матеріали та методи досліджень» автор описує контингент обстежених та методи, які були використанні при виконанні роботи. Вони адекватні та досить інформативні. Особливу увагу автор приділяє методиці використання Real-time PCR для визначення якісного та кількісного складу мікробного пейзажу піхви.

Третій розділ роботи присвячено висвітленню результатів власних комплексних бактеріологічних досліджень вмісту цервікального каналу та склепіння піхви при бактеріальному вагінозі. Проведене автором дослідження показало, динамічні зміни мікробіоценозу піхви, які залежали та віку хворих і від ступня тяжкості бактеріального вагінозу, зокрема звернуто увагу на зростання рівня колонізації облигатними

анаеробами, зокрема, *Mobiluncus* spp. та *Atopobium vaginae*, а також появу різних видів мікоплазма .

У розділі 4 описано роль впливу різних місцевих чинників на колонізаційну резистентність слизової оболонки піхви, зокрема, значну увагу приділено змінам РН вагінального секрету. Гуморальний компонент неспецифічної резистентності на тлі дисбіозу різного ступеня перебував у різному функціональному стані. Насамперед це стосувалося IgM, секреторного IgA та лізоциму, що дозволило констатувати наявність комбінованого локального імунодефіциту в осіб із дисбіозом.

П'ятий розділі представляє результати дослідження особливостей функціонування імунної системи у пацієток з бактеріальним вагінозом за умов наявності дисбіозу різного ступеня, демонструючи зміни вмісту в крові CD3- та CD4-лімфоцитів, цитотоксичних Т- та Т-CD8 лімфоцитів., NK-клітин (CD16) та В-лімфоцитів (CD22), Запропоновано розроблену модель прогнозування ймовірності розвитку бактеріального вагінозу.

На підставі узагальнення таких даних та використання математичних методів аналізу описано системний вплив різних факторів на стан мікробіоти піхви та стан колонізаційної резистентності слизової оболонки піхви. При дисбіозі на тлі загального лімфоцитозу мало місце поступове зменшення вмісту, що було виражено максимальною мірою при БВ. Це дозволяло встановити прогресування Т-клітинного імунодефіциту при розвитку дисбіозу. Реакція) відзначена тільки при БВ.

Важливими є результати досліджень викладених у 6 розділі. Автор описує та аналізує вплив деяких факторів системи гормональної регуляції на колонізаційну резистентність піхви з використанням математичних методів аналізу. Було відмічено, що реакція гормональних систем при бактеріальному вагінозі характеризувалася розвитком первинного гіпергонадотропного гіпогонадизму з гіпоестрогенією та гіперанрогенією. Дискримінантний аналіз даних

засвідчив, що ступінь дисбіозу характеризували кортизолу, естрадіолу та фолікулостимулюючого гормону. Отримані результати щодо впливу системи гормональної регуляції на показники мікробного біоценозу, локальної місцевої колонізаційної резистентності та імунної системи відображають формування єдиної гормонально-імунної системи, яка формується в умовах вагінального дисбіозу.

У 7 розділі викладені результати прогнозування ризику виникнення та ступеня тяжкості дисбіозу та бактеріального вагінозу за показником нормобіоти та індексу умовно-патогенної мікрофлори. Побудова логістичної моделі регресії показала, що ризик розвитку дисбіозу за показником нормобіоти статистично значуще підвищується при зростанні рівня в крові IL2, TNF. Запропоновано лінійну нейромережеву а модель для визначення ступеня тяжкості дисбіозу, використовуючи різні важливі показники та створено інтерфейс експертної системи прогнозування ступеня тяжкості дисбіозу. Запропоновано також лінійну непромережену модель для визначення ступеня тяжкості дисбіозу за показником індексу умовно-патогенної, яка передбачає вивчення рівнів секреторного IgA, лізоциму, γ - INF і трансформуючого фактору росту 1β у вагінальному секреті а також вміст C4 комплементу та IL8 у крові

Робота завершується розділом аналізу та узагальнення одержаних результатів в якому автор докладно і логічно пояснюючи, підводить підсумок представлених у роботі результатів дослідження, обґрунтовує найважливіші факти і положення. Дисертант досить вдало проводить аналіз отриманих результатів порівнюючи основні етапів наукового пошуку. В кінці роботи представлено висновки та практичні рекомендації, які повністю відображають результати проведених досліджень і їх логічним завершенням.

В процесі ознайомлення з роботою виникли деякі зауваження, наприклад, велика кількість русизмів і як і будь-якій роботі такого плану зустрічаються окремі стилістичні та орфографічні неточності, відсутні деякі скорочення у відповідному списку, наприклад, ГЕ, обґрунтування вивчення певних показників у розділі матеріали і методи дослідження, але вони які не суттєві, стосуються форми викладення матеріалу, але не заперечують новизни і науково-практичної значущості роботи.

У порядку наукової дискусії бажано одержати відповіді на наступне запитання:

1. Чи буде склад мікробіоти реально характеризувати нейрогуморальні порушення в жіночому організмі при бактеріальних вагінозом?
2. Який це матиме вплив на корекцію лікування бактеріального вагінозу?
3. Наскільки економічно доцільно проводити запропоновані Вами дослідження в звичайних гінекологічних клініках?

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

Відповідність напряму досліджень і змісту дисертації галузі науки, формулі спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради. За напрямком досліджень і змістом дисертаційна робота Грузевського Олександра Анатолійовича «Вплив місцевих факторів колонізаційної резистентності, імунного статусу та стану нейрогормональної регуляції на розвиток та прогресування бактеріального вагінозу», 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».

Рекомендації щодо використання результатів дисертації в практиці

Отримані автором результати бактеріологічного та імунологічного досліджень обґрунтовують доцільність системного вивчення стану організму жінки при підозрі на вагінальний дисбіоз і без сумніву при підозрі на іншу патологію репродуктивної системи в клінічній практиці гінекологічних та інших такого типу відділень. Важливе значення мають нові наукові дані для їх широкого використання в програмах лекцій вищих медичних навчальних закладів і закладів післядипломної освіти.

Дані про відсутність порушень академічної доброчесності. Розглянувши дисертаційну роботу Грузевського Олександра Анатолійовича «Вплив місцевих факторів колонізаційної резистентності, імунного статусу та стану нейрогормональної регуляції на розвиток та прогресування бактеріального вагінозу» 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.

Дисертаційна робота Грузевського Олександра Анатолійовича «Вплив місцевих факторів колонізаційної резистентності, імунного статусу та стану нейрогормональної регуляції на розвиток та прогресування бактеріального вагінозу» є закінченим науковим дослідженням, у якому вирішена важлива наукова проблема –

підвищення ефективності діагностики та прогнозування розвитку бактеріального вагінозу шляхом визначення впливу нейрогормональної регуляції, імунного статусу та місцевих факторів колонізаційної резистентності на біоценоз піхви. Дисертаційна робота Грузевського О. А. 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.

Завідувач кафедри мікробіології,
вірусології, імунології та епідеміології
Тернопільського національного медичного
університету імені І. Я. Горбачевського
МОЗ України

доктор медичних наук, професор

 Климнюк С. І.

Особистий підпис



завідувач
Заступник ректора з кадрових питань
Тернопільського національного
медичного університету



