

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри мікробіології, вірусології, епідеміології з курсом інфекційних хвороб медичного факультету Ужгородського національного університету МОН України Коваль Галини Миколаївни на дисертаційну роботу Калініченко Світлани Вікторівни «МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ 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 дисертації.

На сьогодні розповсюдження стафілоkokів носить генералізований характер. Носійство широко розповсюджене, майже не реєструється і виявляється лише при травмах та зниженні захисних сил макроорганізму. Збитки, яких зазнає суспільство через втрату працездатності з-за стафілококової інфекції, поступають лише грипоznій інфекції. Серед причин ураження стафілококами можна відмітити численні епідеміологічні аспекти, які пов'язані зі збільшенням контингенту осіб зі зниженою опірністю організму, концентрацією міського населення, внутрішньо-лікарняною циркуляцією полірезистентних штамів, невдалим вибором препаратів для антибіотикотерапії, тому саме серед пацієнтів лікувальних закладів необхідний моніторинг носійства з метою запобігання поширення інфекції. Отримані дисертаційні експериментальні дослідження Калініченко С.В. надзвичайно актуальні та представляють практичний інтерес, оскільки їх дані можуть бути використані для подальшого аналізу патогенної та умовно патогенної мікрофлори дихальних шляхів та перспективної розробки засобів для їх лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами:

Актуальність теми також підтверджується виконаним комплексом досліджень в

рамках науково-дослідних робіт Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (ДУ ІМІ НАМН): «Застосування електромагнітних полів (ЕМП) для посилення утворення окремих метаболітів та підвищення стабільності біологічних властивостей їх продуцентів» (галузевий шифр АМН 74/2007, № держреєстрації 0107U001639); «Біологічні основи розробки синбіотичних комплексів за умов застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль» (галузевий шифр АМН 111/2013, № держреєстрації 0113U001517) та «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів» (галузевий шифр НАМН 129/2016, № держреєстрації 0116U000864), що відповідають пріоритетним напрямкам розвитку фундаментальної і прикладної медичної науки і спрямовані на вирішення актуальних проблем охорони здоров'я в Україні.

Здобувач був відповідальним виконавцем зазначених тем, проводив аналіз світової наукової літератури, планував та брав безпосередню участь в експериментальних дослідженнях, проводив їх облік, аналіз і статистичну оцінку, робив висновки, узагальнював отримані результати, писав відповідні праці.

Наукова новизна та теоретичне значення дослідження. Оцінюючи найважливіші здобутки дисертаційного дослідження, варто вказати на наступні результати, що мають вагому наукову новизну – це експериментальна частина роботи дисертанта.

Вперше теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено кардинально новий підхід щодо удосконалення методів профілактики стафілококового бактеріоносійства. Запропоновано мукозальну кандидат-вакцину з антиадгезивним і пробіотичним компонентами. Поглиблено рівень знань відносно популяційного рівня *Lactobacillus spp.* на слизових оболонках ВДШ за умов хронічної ЛОР-патології. 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. Вперше показано ефективність інтраназальної форми для імунопрофілактики/лікування стафілококового бактеріоносійства з одночасним відновленням мікробіоценозу слизової оболонки та стимулюванням місцевих ланок імунної системи.

Практичне значення результатів дослідження. Робота має безсумнівний практичний вихід, який ґрунтується на розробці нових науково обґрунтованих підходів для отримання експериментальних зразків нативних поверхневих антигенів *S. aureus* з високою антиколонізаційною здатністю. Запропоновано і впроваджено в бактеріологічні лабораторії України метод для стандартизації приготування мікробних суспензій, отримано патент на винахід та п'ять патентів України на корисну модель.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій підтверджуються комплексним підходом до вирішення поставлених задач, репрезентативною кількістю мікробіологічних методів досліджень, статистичною обробкою отриманих результатів. Обрані автором сучасні та інформативні методи досліджень дозволили повністю виконати поставлені задачі, які сформульовано відповідно меті досліджень. Завдяки комплексному підходу до вирішення поставленої у роботі мети, автором повністю розкрито суть проблеми, що вивчалась, а також обґрунтовано практичні рекомендації.

Дисертаційна робота відповідає профілю 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 спеціальності 03.00.07 – мікробіологія.

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 60 наукових праць, з них 1 зарубіжна колективна монографія, 29 статей (2 - одноосібно) у наукових фахових виданнях (з них 3 публікації у виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus (Q4); 1 патенту України на винахід; 4 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 методичних рекомендацій; 17 тез.

Послідовність викладу і оцінка змісту дисертації. Дисертаційна робота викладена на 407 сторінках друкованого тексту (основний текст на 312 стор.), містить вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, шість розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки, практичні рекомендації та список використаних першоджерел (504 посилань). Дисертаційна робота містить 80 таблиць, 48 рисунків і 3 додатки.

У вступі чітко обґрунтовано актуальність проблеми, науково коректно сформульовано мету, яка корелює з темою та конкретизується у завданнях, встановлено об'єкт та предмет роботи. Логічно окреслено систему використаних в роботі дослідницьких методів.

Перший розділ дисертації представлено у вигляді огляду літератури, який подано як аналіз основних наукових публікацій за темою дисертаційної роботи з використанням вітчизняних і іноземних джерел, переважно останніх десяти років. Загальний обсяг огляду літератури відповідає діючим вимогам.

В другому розділі описані методи і об'єкт дослідження. Достатня кількість проведених досліджень дозволила провести достовірну оцінку отриманих результатів та водночас вказує на правильні методичні підходи, що використовувались при виконанні дослідження. Автором ґрунтовно описані всі методи використанні в роботі.

Власні дослідження, описані у третьому розділі «МІКРОФЛОРА СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК НОСОГЛОТКИ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *S.AUREUS*».

Встановлено, що при ЛОР-патології спостерігається достовірне зниження популяційного рівня лактобацил порівняно з показниками практично здорових людей. Це не суперечить даним літератури про суттєву захисну роль

нормофлори слизових оболонок та можливість їхнього застосування для профілактики нозокоміальних інфекцій.

З'ясовано, що у практично здорових осіб зі слизових оболонок зіву найчастіше вилучались коагулазонегативні стафілококи, α -гемолітичні стрептококи (*S. mitis* і *S. dysagalactiae*), негемолітичні стрептококи (*S. mutans*), *Lactobacillus* spp., непатогенні коринебактерії та бактерії родів *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*. Зі слизових оболонок носа практично здорових осіб найчастіше вилучались коагулазонегативні стафілококи, непатогенні нейсерії, непатогенні коринебактерії та аерококи.

Порівняльний аналіз мікробіоценозів бактеріоносців *S. aureus* та хворих на ЛОР-патологію показав низький популяційний рівень бактерій роду *Lactobacillus* при хронічних інфекціях ВДШ.

Автором доведено, що видовий, кількісний склад і частота вилучення окремих представників мікрофлори носової порожнини при хронічних ринітах і синуситах та у носіїв і практично здорових осіб суттєво відрізнявся.

Також показано, що при ЛОР-патології відбувалось зниження популяційного рівня лактобацил, а як етіологічний чинник превалював *S. aureus*, а всі клінічні ізоляти *S. aureus* були здатні утворювати біоплівки.

Дисертантом отримано нові наукові дані щодо чутливості золотистих стафілоkokів до протимікробних препаратів за різних умов культивування, та їх чутливості до дезінфекційних засобів.

У розділі 4 «Міжмікробні взаємовідносини вивчення впливу бактеріальних токсинів на окремі ознаки мікроорганізмів для розуміння механізмів міжбактеріальних взаємодій представлено імунобіологічну характеристику ліпополісахариду, отриманого з клінічного ізоляту *E. coli* 126. Дисертантом показано, що досліджений ЛПС *E. coli* 126 представлений гетерогенною популяцією, яка включає два основних типи молекул: високомолекулярний S-ЛПС з O-ланцюгами різної довжини і низькомолекулярний R-ЛПС, який не містить O-специфічних полісахаридних ланцюгів. Тобто, показано типовий для S-форм ЛПС бімодальний розподіл. Це

підтверджується наявністю класичного профілю у вигляді "сходи" на електрофореграмі. З'ясовано, що додавання до середовищ культивування тест-мікроорганізмів екзо- і ендотоксинів в дозі 0,1 мл на 1,0 мл поживного середовища стимулює ростові й адгезивні властивості грамнегативних тест-культур та підвищує їх здатність до біоплівкоутворення.

Таким чином, отримані результати в ході вивчення *E. coli* 126 показало, що в початковому препараті ЛПС містяться S- і R-форми молекул, що характерно для більшості S-форм ЛПС грамнегативних бактерій.

Результати пошуку штамів-кандидатів лактобацил з альтернативних еконіш та характеристика їх біологічних властивостей дослідження представлені в розділі 5. Для пошуку потенційних штамів-кандидатів проведено оцінку конкурентних властивостей штамів лактобацил, вилучених від практично здорових людей віком 17-23 років та з альтернативних еконіш – кишечника бджіл. Автором встановлено, що за мікроаерофільних умов культивування найбільш сильним антагоністом стосовно штамів коринебактерій виявився штам *L. plantarum*, вилучений з кишечника бджіл, який також пригнічував ріст у 27,3 % тест-культур *S. aureus*.

У шостому розділі «Вплив метаболітів лактобацил на прокаріотичні й еукаріотичні клітини» дисертант вказує, що тільки три штами лактобацил були найбільшими антагоністами золотистих стафілококів: *L. rhamnosus* GG П, *L. casei* Л та *L. plantarum* Б. Тому в експериментах цього розділу були використані метаболіти зазначених штамів. Автором визначено, що метаболіти лактобацил здатні пригнічувати ріст золотистих стафілококів як за аеробних, так і за мікроаерофільних умов культивування. Найбільшою інгібуючою здатністю володіли метаболіти *L. plantarum* Б, отримані за мікроаерофільних умов культивування лактобацил. Тобто експериментально встановлено, що метаболіти лактобацил пригнічують продукування ферментів агресії у золотистих стафілококів. Шляхом порівняльного аналізу встановлено, що культури клінічних ізолятів лактобацил знижували здатність до біоплівкоутворення під впливом метаболітів *L. plantarum* Б, а у золотистих

стафілококів призводили до зниження здатності біоплівкоутворення. Також експериментально визначено, що під впливом метаболітів лактобацил кількість НПП збільшується в 2,3-3,7 ($p < 0,01$) рази у порівнянні з контролем, а найбільш сильними із застосованих активаторів є метаболіти штаму *L. plantarum* Б, вилученого з кишечника бджіл.

В ході проведення молекулярно-генетичних досліджень «Отримання і імунобіологічна характеристика антигенних зразків з *S. aureus*» (розділ 7) автором визначено що при отриманні стафілококових адгезинів доцільно спочатку підвищувати адгезивні властивості тест-культури, а потім отримувати адгезини. Таким чином, за результатами тестів, встановлено безпечність отриманих зразків. В подальші експерименти було взято тільки зразок Ag5, як найбільш перспективний.

У розділі 8 «Експериментальне визначення можливості застосування *Lactobacillus* spp., їх метаболітів та стафілококових антигенів для ерадикації золотистого стафілокока», що спостереження за тваринами протягом п'яти діб показало нешкідливість зразків, що досліджувались. Всі тварини були активними, а приріст їхньої маси тіла збільшувався, в середньому, на 10-15 % ($p \leq 0,05$). Пероральне дослідження зразків на гостру токсичність показало відсутність клінічних симптомів інтоксикації (порушення координації руху, наявність судом, стан волосяного і шкірного покриву, забарвлення слизових оболонок, положення хвоста тощо). Всі тварини протягом терміну спостереження (7 діб) набирали вагу. Приріст їхньої маси тіла збільшувався, в середньому, на 10-16 % ($p \leq 0,05$). Таким чином, дисертантом запропонована модель хронічного стафілококового тонзиліту надасть можливість для розробки й вивчення нових препаратів для профілактики та лікування отоларингічних захворювань. В ході експерименту Калініченко С. В. розроблена відворювана лабораторна модель назального носійства стафілококового генезу, яка може бути використана в мікробіологічних (бактеріологічних) лабораторіях науково-дослідних інститутів та біотехнологічних виробництвах для дослідження закономірностей формування хронічного стафілококового носійства та оцінки

потенційної ефективності способів корекції цих порушень. Тобто, експериментально показано позитивний вплив лактобацил на протиінфекційну резистентність слизових оболонок верхніх дихальних шляхів.

Отримані результати вказують на необхідність цілеспрямованого пошуку і розробки нових імунобіологічних препаратів, які будуть брати активну участь у формуванні протиінфекційної резистентності слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, пригнічувати колонізаційні властивості збудників і будуть безпечними для людини.

В розділі «Аналіз і узагальнення результатів дослідження» здобувач підводить підсумок проведених досліджень, аналізує отримані результати та проводить їх аналіз із використанням сучасних наукових публікацій. Завершується робота розгорнутими висновками, які в повній мірі відповідають поставленій цілі і задачам роботи, є логічними та відображують основні результати дисертаційної роботи. Виходячи з аналізу основної частини дисертації, можна зробити висновок, що мета дисертаційної роботи в ході виконання дослідження була досягнута, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею

Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення.

При рецензуванні дисертації виникли деякі зауваження стилістичного характеру (орфографічні помилки, випадки стилістичної неузгодженості, деякі невдалі вирази і терміни), які не впливають суттєво на узагальнену позитивну оцінку представленої роботи. При беззаперечній позитивній оцінці дисертації, у рамках наукової дискусії, бажано було б мати відповідь пошукувача на наступні запитання:

1) Чи відомо дисертантці із власних досліджень, або із даних літератури, наскільки тривалий час після дії метаболітів лактобацил культури *S. aureus* зберігають втрачені властивості? Чим можливо пояснити такий вплив?

2) Чому саме бджоли були взяті як об'єкт для пошуку потенційних штамів-кандидатів серед представників роду *Lactobacillus*?

3) Чи проводили випробування кандидат-вакцини на добровольцях, або чи планується?

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Калініченко Світлана Вікторівна «МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ 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 є самостійною завершеною науково-дослідною працею, що містить нові науково обгрунтовані результати. За актуальністю та медико-соціальною значущістю теми, обгрунтованістю наукових положень і висновків, достовірністю та новизною отриманих результатів, повнотою їх викладу в опублікованих працях, оприлюднення на медичних форумах, практичною значущістю дисертаційна робота відповідає вимогам п.п. 9, 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567 зі змінами, а її автор Калініченко Світлана Вікторівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Зав. кафедри мікробіології, вірусології,
епідеміології з курсом інфекційних хвороб
медичного ф-ту УжНУ

Коваль

д.м.н., професор Г. М. Коваль

Підпис завідувача кафедри завіряю
Вчений секретар УжНУ



Melnyk

О. О. Мельник