

ВІДЗИВ

офіційного опонента доктора медичних наук, професора Бірюкової Світлани Василівни на дисертаційну роботу Степанського Дмитра Олександровича «Різнобіотопні ауто симбіонти роду *Aerococcus* та мікробіологічне обґрунтування їх використання як пробіотиків», подану в спеціалізовану вчену раду Д 64.618.01 при ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

Актуальність теми. Вивчення взаємовідносин макро- і мікроорганізмів має довготривалу історію. Однак і до теперішнього часу чисельні аспекти їх взаємодії потребують свого рішення. Взаємовідносини хазяїна та мікробіоти складні і відбуваються на метаболічному, регуляторному, внутріклітинному та генетичному рівні. Мікробіота впливає на життєздатність організму як локальними, так і системними ефектами. Під впливом мікробіоти ряд сполук, які потрапляють в організм, можуть трансформуватися в промутагени, мутагени та канцерогени, різні імуномодулюючі агенти, результатом чого є розвиток імунної відповіді організму хазяїна на змінену мікробіоту та її відторгнення. У випадку коли компенсаторні фактори екологічної системи порушено, з'являються явища дисбіозу, в результаті якого розвиваються різні патологічні процеси та інші небажані наслідки (формування антибіотикорезистентності, появи атипівних штамів, нових мікробних біотипів та інш.). Для відновлення мікрофлори розроблені різні класи пробіотичних препаратів.

Достатньо вивченні найбільш поширені представники мікрофлори макроорганізму, однак і до сьогодні не всі аспекти складу, кількісної характеристики бактерій мікробіоти відомі.

Так, мікроорганізми роду *Aerococcus* є невід'ємною частиною мікробіоценозів людини та тварин, що в сукупності з відсутністю факторів патогенності, широким розповсюдженням, високою антагоністичною

активністю, відсутністю моделей відтворення інфекції і т. і. дозволяє розцінювати їх як складову нормальної мікрофлори. Крім того, існує досвід використання *A. viridans* для корекції порушень мікробіоценозів при системному та місцевому застосуванні. Проте, мікроекологія та властивості роду *Aerococcus* вивчені не повністю, а потенціал використання їх в якості засобів корекції мікробіоценозів розкрито недостатньо.

Відомо, що пробіотичні препарати поряд з позитивними властивостями, можуть заподіяти шкоду за рахунок конкурентної переваги і викликати екологічний дисбаланс. Крім того, пробіотичні мікроорганізми навіть людського походження, можуть бути імунологічно несумісними з реципієнтом, якому вони призначені і незабаром після припинення їх вживання швидко елімінуються з організму.

Це стало підставою для розробки концепції ролі ще мало вивчених представників роду *Aerococcus* у відтворенні нормоценозу та створенню пробіотичних препаратів на основі їх аутоштамів і аутоасоціацій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках основного напрямку наукової діяльності кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Комунікативно-адаптивні взаємовідносини грампозитивних каталазонегативних мікроорганізмів роду *Aerococcus* та умовно-патогенних мікроорганізмів» (№ держреєстрації 0113U001948).

Автор поставив метою роботи визначити роль представників роду *Aerococcus*, виділених з різних біотопів макроорганізму, в формуванні нормоценозу, значення в патологічному процесі; і на основі отриманих даних обґрунтувати використання їх як пробіотиків.

Сформульовано завдання, які автор виконав в повному обсязі, що дало можливість досягнути мети та обґрунтувати нові наукові положення.

Наукова новизна одержаних результатів і їх теоретичне значення. В ході виконання роботи вирішена проблема ролі сукупності симбіонтів *A. viridians* різних біотопів мікробіоти макроорганізму. На основі вивчення

біологічних властивостей, кількісних та якісних показників вони були віднесені до нормальної мікрофлори. Показано, що популяція аерококів неоднорідна, має якнайменше 4 біотиби за чутливістю до антибіотиків, ауксотрофністю та біохімічними властивостями. Встановлена первинна роль симбіонтів *A. viridians* проти умовно патогенної флори з тих же біотопів. Вперше показано, що більш висока адгезивна здатність притаманна в умовах контакту з клітинами господаря в порівнянні з гетероадгезією. Вперше вивчена транслокація *A. viridians* і доведено, що при порушенні бар'єрної функції кишечника вони проникають в інші органи та тканини. Доведено на експериментальних моделях різних інфекцій тварин ефективність, безпека використання ауто симбіонтів роду *Aerococcus*.

Автором не тільки визначена вагома роль аерококів в формуванні нормоценозу, а й можливість використання кількісних та якісних показників в прогнозуванні можливої патології.

Вдосконалено методикау культивування та візуалізації біохімічної активності аутосимбіонтів *A. viridans* з використанням селективних факторів. Підібрано антибактеріальний селективний комплекс з визначенням оптимальних доз для виготовлення аутопробіотичного продукту на основі симбіонтів *A. viridans*. Запропоновано біологічний тест для діагностики стану мікробіоценозів, заснований на визначенні кількісних та якісних показників присутності аутосимбіонтних аерококів в різних локусах макроорганізму. Розроблено спосіб тривалого зберігання аерококів в агаровому гелі, що можна використовувати в процесі створення і використання аутопробіотиків (патент України № 106487 «Спосіб підтримки життєздатності аерококів»; патент України на винахід № 114242 «Спосіб підтримки життєздатності аерококів»). Створено колекцію виділених симбіонтів роду *Aerococcus*.

Результати проведених досліджень впроваджено в науково-педагогічну діяльність кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедр мікробіології, вірусології, імунології ВДНЗ України «Буковинський державний медичний

університет», Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет», Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара, Національного фармацевтичного університету, Харківського національного медичного університету, ДВНЗ «Ужгородський національний університет», кафедри мікробіології, вірусології та імунології та кафедри епідеміології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця.

Ступінь достовірності та обґрунтованості основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих в дисертації. Огляд та аналіз даних джерел літератури дозволяють сформулювати мету і завдання дисертаційної роботи. Методологічний підхід та використання сучасних, відомих і розроблених методів повністю відповідають запланованим дослідженням. Аналіз та узагальнення результатів роботи, висновки логічно витікають з наведених даних та всебічно обґрунтовані.

Достовірність результатів дослідження. Масштабно вивчена роль аерококів в нормі та патології макроорганізму. Кількість досліджень, методологічна та методична характеристика роботи дає змогу підтвердити достовірність результатів, які опрацьовані з використанням методів математичної статистики та представлені в 38 наукових працях (4 - одноосібні), серед них 25 статей (18 - у наукових фахових журналах, 7 - у міжнародних виданнях, 15 - включено до міжнародних наукометричних баз), 1 патент України на корисну модель, 1 патент України на винахід, 11 тез доповідей на наукових міжнародних конгресах, з'їздах, конференціях.

Особистий внесок здобувача. Здобувач особисто виконав патентно-інформаційний пошук за темою дисертації, проаналізував та узагальнив дані літератури, сформулював висновки. Разом з науковим консультантом сформульовано тему, мету і завдання роботи, методологію її виконання. Здобувачем особисто було проведено виділення, ідентифікацію симбіонтів роду *Aerococcus* з різних біотопів макроорганізмів, вивчено їх біологічні

властивості, здійснено поділ на біотиби та дана порівняльна характеристика. Самостійно проведено дослідження адгезивних властивостей симбіонтів *A. viridans*, вивчено явище транслокації аерококів, проведено експерименти з вивчення ефективності та безпеки симбіонтів аерококів на тваринах. Автором підібрано селективний антимікробний комплекс, який використовувався для культивування *A. viridans*. Запропоновано біологічний тест для додаткової діагностики стану мікробіоценозів, розроблено спосіб зберігання аерококів. Персональний внесок автора у всіх опублікованих із співавторами працях наводиться за текстом дисертації та в авторефераті у списку наукових робіт.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається з анотації, списку друкованих праць, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, 6 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, що включає 304 посилання (з них 111 із кириличною графікою, 193 - із латинською) та додатків. Робота викладена на 375 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 84 таблицями та 56 рисунками.

Основний зміст роботи. Дисертаційна робота викладена у 8 розділах, з яких 6 – власні дослідження. Робота починається з вступу, в якому викладена актуальність, мета та завдання досліджень, наукова новизна, практичні рекомендації, достовірність і повнота викладення власних досліджень, обсяг і структура дисертації.

В розділі **огляду літератури** узагальнено дані, що відображають сучасний стан використання пробіотиків з аутоштамів мікроорганізмів, детально вивчається мікроекологія мікроорганізмів роду *Aero coccus* та їх роль у мікробіоценозах людини і тварин, наводиться детальна характеристика біологічних властивостей *A. viridans*, а також показники активності мікроорганізмів роду *Aerococcus*, що дозволяють віднести їх до нормальної мікрофлори та використовувати в якості основи для пробіотиків.

Розділ матеріали та методи досліджень. В цьому розділі представлено матеріали і методи, як відомі, так і розроблені, що були використані для вирішення поставлених завдань. Об'єктом і матеріалом досліджень були штами *A. viridans*, виділені з різних біотопів людини і тварин, а також тест-мікроби патогенних і умовно патогенних бактерій, токсин стафілококу тощо. Гістологічне і до клінічне випробування *A. viridans* в якості пробіотика були використані білі миші лінії Вістар, кролики та поросята.

Як зауваження треба відмітити, деякі тести викладені стисло, а деякі – надто детально, наприклад тест визначення азоту, який відтворювався згідно Наказу МОЗ України № 169 від 15.04.2005 р. Треба вказати чи визначення адгезивної активності проводилось за Вашою модифікацією, чи за відомою методикою. В підрозділі 2.12 повторюються критерії оцінки результатів адгезії.

Розділ 3. Дослідження біологічної активності симбіонтів *A. viridans* різного походження. Результати досліджень, представлені в цьому розділі, дали змогу виявити, що симбіонти *A. viridans* є представниками нормофлори різних біотопів людини і тварин, і на основі біологічних властивостей автору вдалося розподілити аерококи на 4 біотипа, які відрізнялись за ферментативною, адгезивною, антагоністичною активністю, ауксотрофністю, відношенням до антибіотиків. По морфологічній характеристики вони не мали різниці і відносились до роду Аерококів. Ці дослідження мають велике значення для більш детального виявлення розповсюдженості різних біотипів аерококів в біотопах людини і тварин. Показано, що різні біотипи *A. viridans* відрізняються по продукції активної кисню, це має велике значення в прояві антагоністичної активності.

Треба зазначити, що в даному розділі повторюються деякі методи, описані в відповідному розділі, при чому викладені більш детально, також більш доцільно було перенести аналіз інших авторів до обзору літератури.

Розділ 4. Захисна роль аутосимбіонтів аерококів в організмі людини. В цьому розділі автор представив матеріали по кількісному складу та впливу

аерококів на формування мікробіоценозу в різних біотопах людини і тварин. Так, було виявлено, що високий вміст аерококів в фекаліях (10^5 КУО/г) свідчить про нормобіоз. Середній рівень 10^3 - 10^4 корелює з явищами компенсованого дисбіозу, низкий (10^2) або нульовий – характерний для некомпенсованих форм дисбіозу, що може бути використано при оцінці дисбіотичних порушень кишечника.

Дослідження ролі *A. viridans* в формуванні резистентностіпологових шляхів дало змогу також виявити особливості впливу аерококів на їх колонізаційну резистентність. Показано, що високий рівень 10^4 і більш КУО/мл свідчить про еубіоз і високий рівень колонізаційної резистентності. Відсутність аерококів характерна для некомпенсованих форм дисбіозу і наявності вогнищ інфекції. На наш погляд ці дані можуть бути використані для оцінки станупологових шляхів, і особливо це має значення для вагітних і прогнозу можливості ускладненню пологів. Автором надана не тільки кількісна характеристика, а й здатність продукувати водень пероксиду в аеробних та відносно анаеробних умовах симбіонт ними штамми аерококів, вилучених зпологових шляхів. Згідно цих досліджень аерококи були розділені на сильні і слабкі. Продукція пероксиду водню має значення для участі аерококів у відновленні нормоценозу, що дуже важливо в створенні препаратів для санаціїпологових шляхів. Вивчена також адгезивна здібність аерококів до клітин вагінального епітелію, що також має значення їх поряд з лактобацилами у відтворенні нормоценозу. Найбільш виражена адгезивна активність притаманна аерококам піхви.

В 4 розділі представлено також важливі дані щодо антагоністичної активності аерококів при захворюваннях ротової порожнини при різній патології у дітей (кардіопатія, менінгококова інфекція, туберкульоз органів дихання) по відношенню до представників умовно патогенної мікрофлори в порівнянні з штамми, вилученими від здорових дітей. Було показано, що аутосимбіонти *A. viridans*, виділені від здорових дітей, мають більш виражену антагоністичну активність в порівнянні з штамми від дітей з

патологією. Слід відмітити, що антагоністична активність проявлялася до більшості представників умовно патогенних мікроорганізмів, крім кандид.

Розділ 5. Вивчення мінливості *A. viridans* у біотопах. Автором в попередніх розділах було показано, що представники роду *Aerococcus*, входять до складу нормофлори, і відіграють важливу регулюючу функцію в підтримці гомеостазу макроорганізму. Мало вивченим питанням є значення фенотипових та генотипичних ознак в прояві цієї функції. Раніше автор виявив морфологічні відзнаки аерококів, визначені як морфологічні мутанти, але первинна зміна морфології колоній нестабільна і через деякий час зникає. Як правило, морфологічна зміна колоній пов'язана з антагоністичною, оксидазною активністю тощо. Особливо це має значення при використанні аерококів як пробіотиків, тому що під впливом тих чи інших факторів змінюється не тільки морфологічна характеристика, але й зазначені активності. Автором в першу чергу було вивчено вплив антибіотиків на мінливість популяції аерококів. Показано, що суббактеріостатична, сублетальна дози антибіотиків та склад поживних середовищ впливають на синтез клітинної стінки, викликають виникнення морфо-функціональних форм. В зв'язку з цим виникло питання розробки способу тривалого зберігання культур і стабільності їх властивостей. На основі цих досліджень був розроблений оригінальний спосіб збереження культур аерококів в іммобілізованому стані в агаровому гелі з доданням крові.

Розділ 6. Міжвидова і міжродова кооперація мікроорганізмів за участю *A. viridans* з різних біотопів. Вивчення антагоністичної активності представників симбіонтних *A. viridans* дало змогу виявити цікавий на наш погляд феномен – взаємний антагонізм, при цьому найбільш активні в біологічних проявах подавляли життєдіяльність менш активних. Ці дані в повній мірі корелюють з дослідженнями, проведеними з представниками інших родів (наприклад, *C. perfringens* та *C. difficile*), які показали значення взаємодії різних популяційних форм того ж виду в прояві біологічної активності всієї популяції. Не менш значене питання в практиці створення

пробіотичних препаратів є взаємодія пробіотиків з представниками умовно патогенною мікрофлорою та прояві ними захисної функції. В цій серії експериментів було виявлено різнонаправлену дію продуктів метаболізму аутоштамів *A. viridans* на умовно патогенну мікрофлору. Так, чим більше факторів патогенності та вірулентності притаманно мікроорганізму, тим більше він стійкий до дії аерококів. Ці експерименти були проведені на значній кількості умовно патогенних мікроорганізмів (музейних та госпітальних штамів), а також на вібріонах і стафілококовому токсині. Виявлено, що аерококи проявляють виражену конкурентну здібність.

Принципових зауважень к методології не має, але в розділі досить багато займають викладені методи досліджень, який доцільно перенести до відповідного розділу.

Розділ 7. Транслокаційна та корегуюча активність симбіонтних *A. viridans* при експериментальних порушеннях функції кишечника лабораторних тварин. Логічним продовженням досліджень було визначення безпеки застосування аерококів в якості пробіотиків. *A. viridans* володіють транслокаційною активністю, яка залежить від умов експерименту і концентрацій суспензії аерококів, що вводиться перорально і ректально. Фізіологічні дози *A. viridans* (10^8 КУО / мл) не проникають в кров та внутрішні органи тварин, жодним чином не впливаючи на зовнішній стан тварин та їх поведінку. Введення супердоз *A. viridans* (10^{10} КУО /мл) через 24 години призводить до інокуляції аерококів до лімфовузлів, серця, легень, селезінки. Механічне порушення кишечника індукує явище транслокації, що веде до зростання кількості аерококів в крові. Застосування комплексу симбіонтних аерококів в фізіологічних дозах призводить до репарації ушкоджень, сприяє зменшенню негативного впливу при порушенні бар'єрної функції кишечника, покращує гістологічну картину, сприяє покращенню біохімічних та імунологічних показників в порівнянні з контролем.

Симбіонтні штами *A. viridans* в дозуванні 10 млрд. / мл per os не оказують антагоністичної дії на нормальну мікрофлору, яка представлена в

кишечнику мишей в найбільшій кількості (анаероби, біфідобактерії, лактобактерії). Водночас, було відзначено підвищення антагоністичної активності різнобіотопних клонів *A. viridans* в порівнянні з музейним штамом відносно стафілококів, грибів роду *Candida*, *Proteus*, лактозонегативних варіантів *E. coli*.

Показано, що найбільш високою активністю володіють аутоштами в порівнянні з гетерокультурою.

Розділ 8. Доклінічні випробування аутоштамів аерококів та вивчення їх ефективності при профілактиці і лікуванні різних патологічних станів у хворих. Завершенням широкомасштабних досліджень було виявити можливість використання аерококів для нормалізації роботи макроорганізму на моделях різних інфекції, а також вплив аутосимбіонтів на слизову оболонку шлунково-кишкового тракту лабораторних тварин. Проведені доклінічні випробування аутосимбіонтів роду *Aerococcus* довели їх ефективність на експериментальних моделях інфекцій на тваринах (синьогнійна, стафілококова, експериментальний дисбактеріоз, клостридальна), безпечність, добру переносимість та повну доклінічну нешкідливість при різних способах застосування. При створенні аутопробіотиків з симбіонтів *A. viridans* потрібно враховувати явище транлокації, а також такі фактори як адгезивність, антагоністичні властивості, біохімічна активність, гетерогенність, нешкідливість.

В розділі 9 представлені **аналіз та узагальнення результатів**. Автор наголошує, що отримані принципово нові дані, які дозволили уявити роль симбіонтів роду *Aerococcus* в мікробіоценозах людини і тварин, їх нешкідливість, убіквітарність і обґрунтовано використання аутоштамів роду *Aerococcus* в якості основи для персоніфікованого методу корекції дисбіотичних станів.

Аналіз і узагальнення результатів та висновки повністю відображають результати досліджень. Робота виконана методично та методологічно на високому рівні і заслуговує позитивної оцінки.

Принципових зауважень немає, однак:

1. Огляд літератури в цілому відповідає темі дисертації, але бажано більш послідовне викладення біологічної характеристики *A. viridans*. В обзори більш значну увагу приділено різним біологічним препаратам, ніж характеристиці роду *Aerococcus*. Бажано було б більш чіткіше обґрунтувати проблему використання аутоштамів, що вже відома і що потребує вивчення.

2. Як вже зазначено, в розділі матеріали та методи стандартні методики не потребують докладного опису, а методи та способи, розроблені автором при виконанні теми, бажано викласти повно.

3. В більшості розділів особистих досліджень часто повторюються викладання методик і дані літератури, які доцільно було б викласти в відповідних розділах.

При детальному знайомстві з положеннями дисертації виникли деякі запитання:

1. Аутосимбіонти і симбіонти – по суті одне й теж поняття. Як Ви трактуєте ці терміни?

2. Рід *Aerococcus* у сучасній класифікації має 7 видів. Чому було вибрано саме *A. viridans* і які його переваги?

3. Як можна пояснити нечутливість аерококів до антибіотика широкої дії норфлуксацина?

4. Всі дослідження послідовно підтверджують, що найбільш оптимальною культурою для створення пробіотика є аутоштам. Як Ви уявляєте його використання на практиці?

5. Більшість сучасних пробіотичних препаратів багатокомпонентні, чи будуть проявляти аерококи свої властивості в складі подібних препаратів?

Висновок до захисту.

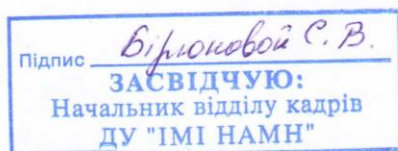
Представлена дисертаційна робота є завершеним, самостійно виконаним дослідженням, результати якого повністю наведені в наукових публікаціях та були представлені на національних та міжнародних конференціях та з'їздах. В роботі вперше поставлено та вирішено наукову проблему щодо ролі

сукупності симбіонтів *A. viridans* різних біотопів макроорганізму, що дозволило віднести їх до нормальної мікрофлори, а також обґрунтовано використання різнобіотопних ауто штамів роду *Aerococcus* як основи для персоналізованого методу корекції дисбіотичних станів.

За актуальністю, високим методичним рівнем, обсягом досліджень, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням, достовірністю отриманих результатів і обґрунтованістю висновків дисертаційна робота Степанського Дмитра Олександровича «Різнобіотопні ауто симбіонти роду *Aerococcus* та мікробіологічне обґрунтування їх використання як пробіотиків», що представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук, повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів №567 від 24 липня 2013 року (зі змінами), а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Доктор медичних наук, професор,
 провідний науковий співробітник
 лабораторії анаеробних інфекцій
 ДУ «Інститут мікробіології та імунології
 ім. І.І. Мечникова НАМН України»

Бірюкова С. В.



Н. А. Белякова