

## ВІДГУК

офіційного опонента проф. С.І. Климнюка на дисертаційну роботу Дмитра Олександровича Степанського «Різнобіотопні аутосимбіонти роду *Aerococcus* та мікробіологічне використання їх як пробіотиків», яка представлена у вчену раду Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», на фздобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

**Актуальність теми дослідження.** З моменту відкриття мікроорганізмів постійно виникає питання про роль мікрофлори в організмі людини і механізми її впливу на нього. Адже в процесі еволюції між організмом людини і оточуючими його мікроорганізмами виникли симбіотичні взаємовідносини, завдяки яким вони стали двома тісно з'єднаними між собою біологічними системами, сформувавши мікробіоценоз і навіть мікробіом. Відомо, що кількісно мікробіота людини на 1-2 порядки перевищує кількість власних соматичних клітин, а мікробіом людини включає в 100 разів більше генів, ніж геном людини

Отже, організм людини та його мікрофлора – екологічна система «людина - нормальна мікрофлора» – є дуже складним, але єдиним взаємопов'язаним і взаємозалежним природним комплексом, стан якого значною мірою визначає здоров'я людини. Розуміння процесів регулювання взаємовідносин у цій системі допомагатиме в розробці стратегії вибору засобів, які спрямовані на корекцію порушень бар'єрів колонізаційної резистентності шкіри та слизових оболонок на шляху збудника інфекції.

Мікроорганізми *A. viridans* широко представлені в мікробіоценозах людини, тварин і навколишньому середовищі. Також відомий позитивний ефект *A. viridans* на організм людини, підтверджений багатьма лабораторними дослідженнями та клінічними спостереженнями. При введенні навіть великих доз *A. viridans* не описано практично жодного випадку порушень з боку макроорганізму, не відзначено побічних ефектів. *A. viridans* мають значний колонізаційний потенціал, антагоністичні властивості, стабільні характеристики росту й розмноження за умов, які близькі до тих, що створюються в шлунково-кишковому тракті. До сьогоденного часу практично не описано жодної моделі експериментальної інфекції, яка викликана *A. viridans*. Проте окрім типового виду *A. viridans* в останні роки описано інших представників роду *Aerococcus*, зокрема, *A. urinae* (1992), *A. christenseni* (1999), *A. sanguinicola* (2001), *A. urinaehominis* (2001), значення яких у мікробіології та медицині, зокрема можливість викликати інфекції) до кінця не вивчені. Це безумовно потребує більш поглибленого вивчення мікроекології роду *Aerococcus*.

За сучасних умов відмічається різке зростання негативних впливів і дії несприятливих екологічних факторів, що супроводжуються глибокими порушеннями мікробної екології організму господаря. Наслідком цих впливів є формування різного виду дисбіозів і вторинних імунодефіцитних станів, при яких різко знижується резистентність організму як до екзогенної, так і до ендогенної інфекції. Для корекції таких станів популярним напрямом

є використання пробіотичних препаратів, що містять штами мікроорганізмів - представників нормальної мікрофлори. Разом з тим, активність цих пробіотиків визначається в першу чергу здатністю до приживлювальності мікроорганізмів, що знаходяться в їх складі, в організмі господаря.

Все більшої популярності в профілактиці і терапії дисбіозів набуває використання як пробіотиків аутологічних штамів мікроорганізмів - представників захисної мікрофлори – краще аутопробіотиків. Вони є штамами коменсальних мікроорганізмів, які пов'язані з позитивним впливом на здоров'я господаря, регулярно виявляються у здорових, й суттєво рідше – у хворих господарів.

Розвитку даної концепції сприяють відомості дані про те, що промислові пробіотичні мікроорганізми самі здатні викликати дисбаланс аутомікрофлори господаря, внаслідок антагонізму індигенних і промислових штамів.

Для аутопробіотичних препаратів теоретично не повинно існувати проблем біологічної сумісності і приживлюваності в біотопі. Ризики виникнення ускладнень і небажаних реакцій при їх використанні повинні бути зведені до мінімуму.

Виходячи з наведеного, поглиблене вивчення мікроорганізмів роду *Aerococcus*, визначення їх ролі у формуванні нормобіоценозів, виникненні патологічних процесів, а також обґрунтування їх використання як пробіотиків є актуальною важливою науковою та практично значущою проблемою, яку автор намагається розв'язати в своїй роботі.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась у рамках планової науково-дослідної теми кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДВінЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Комунікативно-адаптивні взаємовідносини грампозитивних каталазонегативних мікроорганізмів роду *Aerococcus* та умовно-патогенних мікроорганізмів» (№ держреєстрації 011311001948), в якій дисертант був виконавцем та провів виділення, ідентифікацію мікроорганізмів відповідного роду, ізольованих з різних біотопів макроорганізму, вивчив їх біологічні властивості, здійснив їх поділ на біотиби та дав порівняльну характеристику.

**Наукова новизна роботи.** Дисертантом вперше вирішено наукову проблему ролі різнобіотопних симбіонтів *A. viridans*, які було ізольовано від людини та тварин у формуванні їх нормобіоценозів, досліджено їх значення в розвитку патологічних процесів, а також продовжено обґрунтування їх використання як пробіотиків. Автор порівняно оцінив біологічні властивості виділених різнобіотопних симбіонтів роду *Aerococcus*, що розширює уявлення про цих мікроорганізмів. Автором запропоновано популяції *A. viridans*, ізольовані з різних біотопів, поділити їх на 4 біотиби за чутливістю до антибіотиків, їх аутокотрофністю та біохімічними властивостями. Встановлена первинна бар'єрна роль симбіонтів *A. viridans* щодо умовно-патогенної мікрофлори, яка колонізує ті ж самі біотопи.

Важливими результатами роботи є визначення оптимальної адгезивної здатності автосимбіонтів *A. viridans* не тільки щодо еритроцитів, але й епітеліоцитів господаря. Вперше отримано дані про виявлену здатність *A. viridans* до транслокації в нормі та при порушенні бар'єрної функції кишечника та доведена доцільність її

69

вивчення при використанні препаратів з автосимбіонтних штамів.

На експериментальних моделях інфекцій на тваринах і в доклінічних випробуваннях доведена ефективність, безпека і переносимість автосимбіонтів роду *Aerococcus*. Вивчено вплив автоштамів цього роду на біологічні (колонізаційні та популяційні) показники нормальної мікрофлори людини. Виявлена нешкідливість їх перорального застосування в лабораторних тварин. Обґрунтовано використання різнобіотопних автоштамів роду *Aerococcus* як основи для персоналізованого методу корекції дисбіотичних станів.

**Практичне значення роботи.** Дисертантом вдосконалено методику культивування та візуалізації біохімічної активності автосимбіонтів *A. viridans* з використанням селективних факторів. Розроблено протимікробний селективний комплекс, який складається з 8,3 мкг/мл норфлоксацину, 50 мкг/мл мірамістину, 50 мкг/мл борної кислоти і використовується для культивування та виготовлення пробіотику на основі симбіонтів *A. viridans*. Запропоновано біологічний тест для діагностики стану мікробіоценозів, заснований на визначенні біологічних (колонізаційних та популяційних) показників присутності автосимбіонтних аерококів у різних біотопах макроорганізму.

Перспективним є розроблений автором спосіб тривалого зберігання аерококів в агаровому гелі, який можна використовуватися під час створення і використання автопробіотиків (патенти України на винахід і корисну модель). Створено колекцію виділених симбіонтів роду *Aerococcus*, яка увійшла до складу музею культур кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпропетровської медичної академії.

Результати проведених досліджень впроваджено в науково-педагогічну діяльність кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпропетровської медичної академії, кафедр мікробіології, вірусології, імунології Буковинського державного медичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова Тернопільського державного медичного університету, Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара, Національного фармацевтичного університету, Харківського національного медичного університету, Ужгородського національного університету, кафедри епідеміології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Наукові положення, які представлені в дисертації є достовірними та обґрунтованими, що підтверджуються використанням сучасних високоінформативних методів дослідження та вірно обраного системного методологічного підходу. Застосовано адекватні сучасні і класичні методики, стандартні системи, повірені прилади. Об'єкти та методи дослідження, які представлені у науковій роботі, відповідають основним напрямкам роботи. Виконуючи дисертаційні дослідження, завдання, які поставлені автором, вирішені, проаналізовані, доповнюють, але не суперечать сучасним науковим розробкам у відповідній галузі мікробіології щодо дослідження активності та ефективності пробіотиків.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих**

**працях.** Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації роботи, а також узагальнення результатів опубліковані у 38 наукових працях (4 – одноосібні), серед них 25 статей (8 – у наукових фахових журналах, 7 – у міжнародних виданнях) з них 15 джерел включено до міжнародних наукометричних баз), 11 тез доповідей на наукових міжнародних конгресах, з'їздах, конференціях різного рівня. отримано один патент України на корисну модель та один патенті України на винахід,

Таким чином, можна вважати, що ступінь оприлюднення матеріалів дисертації достатній.

**Обсяг і структура дисертації.** Структура дисертаційної роботи відповідає вимогам до докторських дисертацій, у тому числі змінам, викладеним у «Вимогах до оформлення дисертації», затверджених наказом Міністерства освіти і науки України №40 від 12.01.2017 р. Вона написана за загальноприйнятим для таких робіт планом, викладена на 375 сторінках комп'ютерного тексту. Робота включає анотацію, список друкованих праць вступ, огляд літератури, розділ матеріалів і методів досліджень, розділ власних досліджень, розділ щодо аналізу та узагальнення результатів, висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел літератури, що включає 304 найменування (111 кирилицею, а 193 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 56 рисунками і 84 таблицями. Матеріали досліджень викладено в логічній послідовності.

У вступі Д.О. Степанський розкриває сутність наукової проблеми, обґрунтовує актуальність необхідність і важливість проведення майбутніх мікробіологічних досліджень. Тут сформульовано мету, задачі, роботи, предмет і методи дослідження; представлено дані щодо наукової новизни та практичної значущості роботи, особистий внесок здобувача, апробацію результатів досліджень.

Огляд літератури побудований на підставі нових літературних джерел, присвячених сучасним уявленням про мікроекологію мікроорганізмів роду *Aegococcus* та обговоренні їх ролі в мікробіоценозах людини й тварин, а також можливості викликати захворювання. Він написаний лаконічно, критично, що свідчить про високу наукову ерудицію автора в галузі проблеми, що вивчатиметься. Відчувається, що автор добре володіє сучасними даними літератури.

Дисертантом ретельно проаналізовано концепцію використання автотологічної мікрофлори з лікувальною та профілактичною метою та використана достатня кількість вітчизняних та іноземних публікацій.

У розділі 2 «Матеріали і методи дослідження» докладно наведені методики дають змогу відтворити хід дослідження. Вони сучасні, високоінформативні й адекватні поставленій меті та задачам дослідження. Отримані результати оброблені за допомогою сучасних методів статистики, які обґрунтовують вірогідність отриманих результатів та висновків.

Третій розділ складається із 7 підрозділів, які присвячено описанню різноманітних видів біологічної активності симбіонтних *A. viridans*, включаючи їх адгезивну активність до різних клітин.

Особливу практичну цінність при диференціації аерококів

5

набуває їх поділ на чотири біотики за своїми біохімічними властивостями та аукоотрофністю. Особливу цінність мають дослідження антагоністичних та адгезивних властивостей виділених *A. viridans*.

Четвертий розділ «Захисна роль автосимбіонтів аерококів в організмі людини» презентує дані щодо індикаторної ролі *A. viridans* у мікробіоценозі кишечника, забезпеченні неспецифічного захисту пологових шляхів, особливостей симбіонтів *A. viridans* у дітей з кардіоміопатологією, їх активності при менінгококовій інфекції та у дітей, які мали контакти з особами хворими на туберкульоз легень. Підтверджена захисна роль симбіонтів *A. viridans* в організмі людини та показана кореляція між ступенем дисбіозу (кишечник, пологові шляхи) та наявністю *A. viridans*, спостерігалась закономірність зниження рівня симбіонтних *A. viridans* при дисбіозах.

Запропоновано використовувати *A. viridans* для додаткової діагностики дисбіозів кишечника та пологових шляхів.

Мінливість *A. viridans* у біотопах» описана у 5 розділі. Встановлено, що гетерогенність симбіонтів *A. viridans* коливалась залежно від біотопів, що вивчалися. Ці коливання дозволяли більш детально розуміти властивості *A. viridans* у різних біотопах.

Особливої уваги заслуговує розробка способу тривалого збереження культур *A. viridans* за допомогою іммобілізації їх у висохлому агаровому гелі з додаванням 3 % крові. Даний метод було застосовано для зберігання 30 різних автосимбіонтів *A. viridans*, які зберігалися протягом 8 років. Перевірка морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостей культур автосимбіонтів після такого зберігання показала відсутність будь-яких змін у межах вивченої гетерогенності виду.

У 6 розділі представлено результати вивчення міжвидової та міжродової кооперації мікроорганізмів за участю різнобіотопних *A. viridans*. Вивчено взаємну антагоністичну активність симбіонтних *A. viridans*. Відмічено, що більш активні культури пригнічували ріст менш активних, що необхідно враховувати при створенні пробіотичних продуктів на основі автосимбіонтів *A. viridans*. Показано захисну дію симбіонтів аерококів при експериментальній віброінфекції та при введенні стафілококового токсину.

Сьомий розділ висвітлює різноманітні аспекти транслокації та коригуючої активності симбіонтних *A. viridans* при експериментальних порушеннях функції кишечника лабораторних тварин.

Досліджено явище транслокації симбіонтів *A. viridans* у нормі та при порушенні бар'єрної функції кишечника. Відмічено, що при введенні лабораторним тваринам суспензії *A. viridans* у фізіологічних дозах явище транслокації не спостерігалось. Але при одноразовому введенні суспензії аерококів у надфізіологічних дозах ( $10^{10}$  КУО/мл) у крові та внутрішніх органах можна було знайти вказані мікроорганізми. При багаторазовому введенні аерококів у супердозах рівень транслокації також збільшувався. Але слід зазначити, що транслокація спостерігалась тільки у 12 % культур при введенні їх per os у супердозах. У той же час дане явище не впливало на зовнішній стан тварин, та їх поведінкові реакції

Вивчено можливість корекцію порушень мікробіоценозів при їх формуванні у шлунково-кишкового тракту лабораторних тварин комплексом автосимбіонтних аерококів. Їх введення у

фізіологічних дозах сприяло нормалізації стану стінки кишки та поліпшувало біохімічні та імунологічні показники порівняно з контролем, що дозволяє екстраполювати застосування автопробіотиків при порушеннях шлунково-кишкового тракту людини.

Розділ 8 присвячено доклінічному вивченню ефективності аутоштамів *A. viridans* при застосуванні їх для профілактики та лікуванні різних патологічних станів у тварин. Ці особливості було вивчено на моделях синьогнійної та стафілококової інфекцій. Встановлено, що в групі нелікованих мишей частіше наступала загибель тварин від розвитку синьогнійного сепсису і при цьому раніше (2-3 день), ніж у дослідних - 29,2 % випадків проти 0-5,0 % ( $p < 0,05$ ). Відмічено, що у більшості тварин у піддослідних групах вже з перших днів застосування автосимбіонтних штамів аерококів перифокальне запалення було вираженим менше порівняно з контрольною групою. Рани швидше очищалися від гною і покривалися сухим струпом. Незалежно від групи тварин у період загоєння рани знижувалася і забрудненість її синьогнійною паличкою та стафілококами. У тварин, яким рани обробляли аутоштамами *A. viridans*, кількість стафілококів була в 10 разів меншою, ніж у контрольній групі. Ці *A. viridans* не проявляли подразнюючої дії при нанесенні їх на поверхню рани, але сприяли її загоєнню, паралельно різко знижувалась частота висівання стафілококів з виділень ран.

У цьому розділі представлено також дані щодо вивчення антагоністичних властивостей автосимбіонтних *A. viridans* відносно *S. perfringens* – нормальних мешканців кишки мишей. Відзначено виражену антагоністичну дію *A. viridans* на клостридії, що підтверджується зниженням числа випадків їх висівання.

Показана також безпека виділених аерококів-автосимбіонтів при їх пероральному застосуванні у лабораторних тварин.

Описано, що автосимбіонти *A. viridans* мають позитивний вплив на стан нормальної мікрофлори та спричиняють антагоністичний ефект відносно умовно-патогенної флори кишечника поросят.

Дослідження симбіонтів аерококів свідчило про відсутність їх токсичної дії на лабораторних тварин навіть у дозах, що значно перевищували фізіологічні, при різних способах введення.

Розділ 9 «Аналіз і узагальнення результатів досліджень» повністю висвітлює комплекс досліджень, які проведено автором. У ньому зроблено їх порівняння з даними, відомими з інших літературних джерел. Завершується робота 10 висновками, які відповідають меті й поставленим завданням.

Автореферат повністю відповідає вимогам ДАК України. В ньому достатньо повно обґрунтовано актуальність теми, послідовно викладено зміст усіх розділів дисертації, який ідентичний основним положенням дисертації.

**Відповідність дисертації спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради.** Дисертаційна робота Степанського Д. О. «Різнобіотопні аутосимбіонти роду *Aerococcus* та мікробіологічне обґрунтування їх використання як пробіотиків» за формулою спеціальності, напрямками досліджень і галуззю науки повністю відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 та спеціальності 03.00.07 - мікробіологія, медичні науки.

**Рекомендації щодо використання результатів**

дисертаційного дослідження в медичній практиці. Результати дисертаційного дослідження доцільно використовувати при лікуванні хворих з гнійно-септичною патологією, дисбіотичними станами різних біотопів організму та отриманні нових пробіотиків.

**Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення:**

1. Дисертація написана державною мовою, але в представленому тексті є окремі стилістичні неточності, « русизми»;
2. Недоцільно порівнювати біологічні властивості музейних штамів *P. aeruginosa* та клінічних ізолятів (табл. 8.1);
3. Назви таблиць та рисунків слід було оформити відповідно до стандартних вимог.

Під час ознайомлення з роботою до дисертанта виникли такі запитання, на які бажано дати відповідь у процесі наукової дискусії:

1. Яке значення мають дані про чутливість *A. viridans* до фторхінолонів?
2. Ви виділили велику кількість штамів *A. viridans*. Чи відібрали Ви кандидатів на створення пробіотичного препарату і якщо так, то за якими критеріями це зроблено?
3. Чи є у Вас відомості про позитивний ефект застосування аерококів у клініці?
4. Чи планується продовження досліджень, зокрема клінічні випробування пробіотичних продуктів на основі автосимбіонтів *A. viridans* ?

**Висновок.** Дисертація Степанського Д.О. «Різнобіотопні аутосимбіонти роду *Aerococcus* та мікробіологічне обґрунтування їх використання як пробіотиків є завершеною науковою працею, виконаною на сучасному науково-методичному рівні. Робота містить вагомий експериментальні результати та науково обґрунтовані узагальнення, що дозволило вирішити важливу та актуальну наукову проблему – визначення ролі різнобіотопних симбіонтів роду *Aerococcus* у формуванні нормобіоценозів, значення у розвитку патологічних процесів, а також обґрунтування їх використання як пробіотиків. Вона повністю відповідає вимогам, які сформульовані у положенні «Порядок присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (зі змінами, внесеними згідно Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.) та «Вимогам до оформлення дисертації», затверджених наказом Міністерства освіти і науки України № 40 від 12.01.2017 р., а її автор Степанський Дмитро Олександрович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

Завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології  
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет  
імені І.Я.Горбачевського МОЗ України»  
доктор медичних наук, професор С. І. Климнюк



Особистий підпис \_\_\_\_\_

завіряю \_\_\_\_\_

Помічник ректора з кадрових питань  
Тернопільського медуніверситету