

ВІДГУК

доктора медичних наук, професора, професора кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» Кременчуцького Геннадія Миколайовича на дисертаційну роботу Частій Тетяни Володимирівни «Мікробіологічна характеристика грибів роду *Malassezia* та удосконалення методів лабораторної діагностики маласезіозів», подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07. – мікробіологія

Актуальність теми дисертації. Аналіз публікацій останніх років виявив поступовий зсув в розумінні значущості шкірної мікробіоти для підтримки здоров'я людини, хоча досліджень по вивченню мирної взаємодії організму з коменсальними бактеріями шкіри істотно менше, ніж ролі патогенної флори у розвитку шкірних захворювань. Мікробіота шкіри, з одного боку, є одним із захисних механізмів організму, а з іншого - невичерпним резервуаром збудників екзогенних і ендогенних інфекцій. Саме вона утворює екологічний бар'єр, що забезпечує колонізаційну резистентність організму, впливаючи на імунну систему. До теперішнього часу накопичено значний матеріал про роль інфекційних агентів у виникненні, перебігу, підтримці запального процесу при atopічному дерматиті, себорейному дерматиті, екземі. Імовірно, порушення функції шкірного бар'єру і зміни в імунній системі можуть грати роль і сприяють колонізації мікроорганізмами на шкірі пацієнтів з хронічними дерматозами. Умовно-патогенна флора, зокрема грибкова, яка знаходиться на шкірі у багатьох практично здорових осіб, при порушенні бар'єрної функції шкіри може бути збудником шкірних захворювань, а за деяких умов - джерелом алергенів, що сенсibiliзують організм і спричиняють тяжкі алергійні захворювання. У зв'язку з цим особливу увагу привертають умовно-патогенні гриби роду *Malassezia*, які є частиною факультативної флори шкіри людини, а також можуть бути асоційовані з

захворюваннями шкіри: різнокольоровим лишаєм, себорейним дерматитом, маласезійним фолікулітом, атопічним дерматитом, екземою та іншою дерматологічною патологією.

Враховуючи той факт, що в Україні ці гриби практично не вивчалися, відсутні відомості про їх розповсюдженість, видовий склад, особливості культивування та ідентифікації, то не викликає сумнівів актуальність даної дисертаційної роботи, яка присвячено однією з важливих проблем: використанню сучасних підходів до визначення ролі ліпофільних дріжджоподібних грибів роду *Malassezia*, як етіопатогенетичного фактора низки захворювань шкіри та методів їх виявлення та ідентифікації.

Тому, не викликає сумнівів актуальність теми даної дисертаційної роботи, метою якої є підвищення ефективності лабораторної діагностики маласезіозів на підставі поглибленого вивчення біологічних властивостей (мікроскопічних, культуральних, біохімічних, генетичних, антигенних) клінічно-значущих штамів грибів роду *Malassezia*, циркулюючих в Україні,

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

Дисертацію виконано в рамках науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету МОЗ України (ХНМУ) «Оптимізація діагностики й протимікробної терапії гнійно-запальних процесів з урахуванням комунікативних властивостей мікроорганізмів», № держреєстрації 0111U001402 та є фрагментом НДР ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України» (ДУ «ІДВ НАМН»): «Дослідити молекулярно-генетичні механізми патогенезу захворювань шкіри, викликаних грибами *Candida*, *Malassezia* та іншими мікроміцетами, з метою розробки нових методів діагностики», № держреєстрації 0107U012801; «Розробка стандартів проведення вторинної профілактики тяжких і розповсюджених дерматозів», № держреєстрації 0109U002513 (згідно з договором про науково – практичне співробітництво між ХНМУ та ДУ «ІДВ НАМН» № 581/0213). Дисертант є співвиконавцем цих науково – дослідних

робіт, ним проведено мікробіологічні, молекулярно–генетичні та імунологічні дослідження.

Тему кандидатської дисертаційної роботи Частій Т.В. затверджено на засіданні Вченої ради Харківського національного медичного університету МОЗ України від 04.02.2013 р. протокол № 2.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність.

Зміст дисертаційної роботи побудований на відповідному первинному матеріалі, дослідження якого дало можливість сформулювати основні наукові положення, висновки та рекомендації. Сформульовані в дисертаційній роботі Частий Тетяни Володимирівни основні наукові положення та висновки базуються на достатній кількості первинного матеріалу (170 зразків, отриманих зі шкіри тематичних хворих на дерматози, 90 зразків сироватки крові та 34 практично здорових осіб групи контролю). Достовірність основних положень, висновків і практичних рекомендацій, сформульованих у дисертаційній роботі Частий Т. В., ґрунтується на достатньому обсязі виконаних досліджень, використанні адекватних і загально визнаних методів досліджень (мікроскопічних, культуральних, імунологічних, молекулярно-генетичних, біоінформаційного аналізу, статистичних) які дали можливість вилучити зі шкіри хворих 68 штамів маласезій, провести їх ідентифікацію, визначити рівень колонізації шкіри хворих та контрольної групи грибами роду *Malassezia*, отримати експериментальний зразок діагностичного антигену та визначити рівень специфічних імуноглобулінів у хворих на atopічний дерматит та екзему, а також визначити чутливість вилучених клінічних штамів маласезій до антимікотичних препаратів.

Усі експериментальні дослідження проводилися у лабораторій імунології, патоморфології та молекулярної генетики ДУ «ІДВ НАМН» (свідоцтво про атестацію № 100-293/2015 від 20 листопада 2015 р.).

Використані методи наукових досліджень є сучасними і відповідають вирішенню поставлених мети та задач. Робота виконана на високому науково-методичному рівні.

Усі положення, що викладені в дисертації, науково обґрунтовані і витікають із результатів проведених досліджень. Це дає змогу зробити заключення щодо достовірності наукових висновків дисертаційної роботи Частій Т.В.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше в Україні визначено видовий спектр та поширеність грибів роду *Malassezia* у хворих на дерматози: *M. sympodialis* (41,2 %), *M. furfur* (32,4 %), *M. globosa* (23,5 %) та *M. slooffia* (2,9 %).

Визначено первинну структуру ITS гену рРНК шести вітчизняних штамів маласезій, що дозволило методом біоінформаційного аналізу здійснити їх точну філогенетичну ідентифікацію: *M. furfur* – 2 штами, *M. sympodialis* – 2 штами, *M. globosa* – 1 штама, *M. slooffiae* – 1 штама.

Уперше в Україні отримано діагностичний антиген зі штаму-продуценту *M. sympodialis* 97, первинна структура ITS гену рРНК на 1 % відрізняється від типового штаму *M. sympodialis* ATCC 42132. З використанням вітчизняного експериментального зразку діагностичного антигену у 42,2 % хворих на atopічний дерматит та екзему виявлено протималасезійні Ig E антитіла, наявність яких може слугувати додатковим факультативним критерієм для діагностики atopічного дерматиту.

На вітчизняних клінічних штаммах *Malassezia* spp. в досліджах *in vitro* визначено МІК ліпосомально–жирової форми тербінафіну, яка в 10 разів ефективніше МІК субстанції тербінафіну, що обґрунтовує перспективність подальших досліджень розробленої форми для клінічного використання.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблені та впроваджені в практику методи виділення, культивування, типування грибів роду *Malassezia* та визначення їх чутливості до антимікотиків, що сприятиме підвищенню ефективності лабораторної діагностики маласезіозів у

профільних закладах охорони здоров'я України (нововведення - Київ, 2010; методичні рекомендації – Київ, 2009).

Запропоновано спосіб діагностики мікозів стоп, кистей та оніхомікозів заснований на ПЛР діагностиці з використанням пангрибкових праймерів ITS 4 та ITS 5 (патент України на корисну модель № 68645).

Виділено та охарактеризовано штам *M. sympodialis* 97, який є продуцентом специфічного маласезійного антигену для виготовлення тест - систем для діагностики маласезійних дерматозів, зокрема АД (патент України на винахід № 93898).

Отримані штами *Malassezia* вперше в Україні задепоновано в музеї патогенних для людини мікроорганізмів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України» (свідоцтва про первісне депонування № № 27-Д – 31-Д). Це створило можливість для їхнього використання вітчизняними та іноземними фахівцями у наукових дослідженнях та у практичній сфері медицини і ветеринарії.

Результати дослідження впроваджено на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (акт впровадження від 04.02.2013 р.) та в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (акт впровадження від 10.12.2009 р.). Результати досліджень використовуються у практичній роботі лабораторії імунології, патоморфології та молекулярної генетики ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України» (акт впровадження від 23.05.2017).

Повнота викладу наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, в опублікованих працях та авторефераті.

Результати досліджень, основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації кандидатської дисертації Частій Т.В. оприлюднено і обговорено на 11 наукових форумах (з'їздах і конференціях з міжнародною участю). За темою дисертації опубліковано 23 наукові праці (3 – одноосібно), у тому числі 8 статей (5 – у фахових наукових виданнях України, з яких 3

включено до міжнародних наукометричних баз, 2 у закордонних фахових виданнях), 1 патент України на винахід, 1 патент України на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 1 нововведення, 11 тез у матеріалах з'їздів та науково-практичних конференцій.

Автореферат цілком відповідає вимогам, чітко і повно відображає зміст дисертації. Його основні положення повністю співпадають із відображеними в дисертації.

Обсяг і структура дисертації. Робота викладена на 145 сторінках машинописного тексту, містить 12 таблиць, 17 рисунків і складається із анотації (українською та англійською мовами); основної частини: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, чотирьох розділів результатів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій; списку використаних джерел, який налічує 178 посилань (81 кирилицею і 97 латиницею) та додатків.

У анотації (українською та англійською мовами) стисло представлені основні результати дослідження із зазначенням наукової новизни та практичного значення.

У вступі обґрунтовано актуальність проблеми, визначені мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження, сформульовано наукову новизну, розкрито теоретичне та практичне значення роботи, визначено особистий внесок автора, наведено дані про апробацію отриманих результатів.

Розділ 1 (огляд літератури). Дисертантом наведено ретроспективний аналіз таксономії грибів роду *Malassezia* та їх властивостей; роль грибів роду *Malassezia* в патогенезі хронічних запальних дерматозів та АД; методи виділення та ідентифікації *Malassezia* spp.; сучасний стан вивчення маласезійної інфекції в Україні.

Розділ 2. (Матеріали і методи досліджень). Представлена характеристика об'єктів та матеріалів дослідження. Достатньо повно викладено автором всі використані методи дослідження: мікробіологічні,

культуральні, молекулярно-генетичні, імунологічні, біоінформаційний аналіз та статистичні.

Далі у власних дослідженнях (розділи 3-6) представлені результати власних досліджень. Автором удосконалено поживне середовище, яке підвищує вірогідність первісного виділення маласезій. Розроблено схему-алгоритм видової ідентифікації маласезій на підставі вивчення мікроскопічних, культуральних, біохімічних властивостей вилучених клінічних штамів. Згідно розробленій схеми дисертантом було вилучено 68 клінічних штамів грибів роду *Malassezia* та визначена їх видова приналежність. Встановлено, що в Україні циркулюють наступні різновиди маласезій: *M. sympodialis* (41,2 %), *M. furfur* (32,4 %), *M. globosa* (23,5 %) та *M. slooffiae* (2,9 %). Здобувачем визначено високий рівень колонізації шкіри грибами *Malassezia* spp. ($>2,0$ КУО/см²) у 30 % хворих на АД та у 18,6 % хворих на екзему на інтактній шкірі ($p < 0,05$). У 40,1 % клінічно здорових осіб було виявлено гриби *Malassezia* spp., при цьому рівень колонізації становив 1,0 – 1,5 КУО/см². Підвищений рівень колонізації шкіри маласезіями у хворих на АД та екзему підтверджує дані, щодо впливу *Malassezia* spp. на перебіг цих захворювань. При дослідженні ПЛР методом найчастіше позитивний результат виявлення ДНК *Malassezia* spp. визначався у хворих на СД (90,9 %) та РЛ (90,5 %), а відносно рідше у хворих на АД (53,6 %), екзему (44,4 %) та здорових осіб (37,5%). Виділено вітчизняні штами *Malassezia* spp., видову приналежність яких визначено методом секвенування ITS гену рРНК, що дало можливість вперше задепонувати п'ять штамів грибів роду *Malassezia* (*M. furfur* 1169, *M. furfur* 973, *M. sympodialis* 97, *M. sympodialis* 1218, *M. globosa* 102) до музею патогенних для людини мікроорганізмів. Вперше отримано вітчизняний діагностичний антиген з регіонального штаму *M. sympodialis* 97, з використанням якого у 37,1 % хворих на АД та у 5,1% хворих на екзему було виявлено протималасезійні Ig E. Антитіла до антигенів, які представлено Ig G у діагностично - значимих титрах виявлено у всіх хворих

на АД та екзему. Експериментально обґрунтовано доцільність сумісного використання тербінафіну і бензоїлпероксиду, комбінована дія яких визначається адитивним ефектом. Показано ефективність протигрибкової дії ліпосомальної форми тербінафіну МІК якого є меншою в порівнянні з МІК субстанції тербінафіну в 10 разів. Результати дослідження обґрунтовують перспективність розробки нових ліпосомальних форм антимікотиків для лікування грибкових інфекцій.

Результати власних досліджень пройшли статистичну обробку і повноцінно проаналізовані автором.

Усі розділи власних досліджень написано детально та послідовно, наведені в них таблиці та рисунки полегшують сприйняття основних наукових положень, демонструє вміння аналізувати матеріал.

Висновки логічно випливають з матеріалів дисертації. У них відображені сумарні результати роботи.

У практичних рекомендаціях автор запропонувала ефективні методи виділення та ідентифікації маласезій.

Список цитованих джерел літератури містить сучасні фахові публікації, які оформлено згідно чинних вимог.

Зміст автореферату цілком відповідає змісту дисертації.

З огляду на прорецензований матеріал можна зазначити, що мета дисертаційної роботи досягнута, а завдання досліджень виконано повною мірою. Отже, дисертаційну роботу можна вважати завершеною. Робота виконана на сучасному науково-методичному рівні і заслуговує позитивної оцінки.

Разом з загальною позитивною оцінкою необхідно зробити наступні зауваження:

1. В тексті дисертації та авторефераті мають місце стилістичні погрішності, орфографічні помилки та помилки набору тексту.
2. Опис матеріалів та методів дослідження занадто деталізований.

Однак вказані зауваження стосуються переважно структури та оформлення дисертаційної роботи, не мають принципового характеру і не знижують її наукового та практичного значення у цілому.

Оцінюючи в цілому роботу позитивно, хотілося б уточнити окремі положення й отримати відповіді на наступні запитання:

1. Чи враховувався зміст інших видів мікроорганізмів із аналізом їх співвідношення при ізоляції грибів роду *Malassezia* у «locus morbi» (в тканинах шкіри - зішкрябах)
2. Чи враховувалося співвідношення різних форм: міцеліальних і дріжджоподібних клітин при ізоляції грибів роду *Malassezia* з різних осередків ураження.
3. Як ви вважаєте, чи немає взаємостимуляції в асоціаціях між різновидами *Malassezia* sp. у плані протікання патологічних процесів.
4. Чи можна говорити про певного збудника патологічного процесу при наявності асоціацій різновидів *Malassezia* sp.
5. Чи можна говорити про вплив плісневих грибів на тяжкість перебігу уражень, викликаних *Malassezia* sp.
6. З причини широкого поширення *Malassezia* sp. на шкіряних покривах не тільки хворих, але і здорових людей з їх високою алергезуючою здатністю, з огляду на їх алергенний склад, чи не визначалися слідові кількості противомалесезійних IgE у здорових людей, якщо була така контрольна група.

Висновок. Дисертаційна робота Частій Тетяни Володимирівни «Мікробіологічна характеристика грибів роду *Malassezia* та удосконалення методів лабораторної діагностики маласезіозів», є закінченим самостійним науковим дослідженням, в якому отримані нові результати, що в сукупності вирішують наукове завдання мікробіології – підвищення ефективності лабораторної діагностики маласезіозів.

Дисертація за актуальністю, обсягом і рівнем проведених досліджень, науковою новизною і практичною значимістю відповідає п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року та внесеними змінами згідно з Постановою КМ № 656 від 19.08.2015 року до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор Частій Тетяна Володимирівна, заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

