

ВІДГУК

**офіційного опонента, завідувача кафедри вірусології
Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л.
Шупика (наказом МОЗ України від 10.02.2021 №225 було перейменовано
Національну медичну академію післядипломної освіти імені П.Л.
Шупика) доктора медичних наук, професора Дзюблик І.В. на
дисертаційну роботу Бобиря Віталія Васильовича «Ентеровіруси в
структурі дисбіотичних розладів», яка подана до спеціалізованої вченої
ради Д 26.614.01 ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.
Громашевського НАМН України» на здобуття наукового ступеня доктора
медичних наук за спеціальністю 03.00.06– вірусологія**

Актуальність теми. Дисертація Бобиря В.В. присвячена вивченню важливого в наш час питання: з'ясування ролі ентеровірусів в структурі порушень кишкового біоценозу та науковому обґрунтуванню корекції складу нормальної мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору.

Щорічно гострі кишкові захворювання охоплюють мільйони населення земної кулі та зумовлюють значний відсоток летальності серед захворілих. В етіологічній структурі збудників знаходяться бактерії, найпростіші, віруси. Останні мають першість серед патогенів. Будь-яка патологія прямо чи опосередковано впливає не тільки на людину, її органи та системи, а й певним чином змінює нормальну мікрофлору, і в першу чергу шлунково-кишкового тракту. Дисбіотичні порушення стали складовою частиною цілої низки патологічних процесів, особливо, якщо в лікуванні використовувались антибіотики чи інші антимікробні лікарські препарати. Однак, ситуація ще більше погіршується коли до порушення нормальної мікрофлори приєднуються бактеріальні чи вірусні інфекції. Саме тому тема дисертаційної роботи В.В. Бобиря є сучасною і високоактуальною.

Автор поставив собі за мету з'ясувати роль ентеровірусів у розвитку порушень кишкового мікробіому та поліпшити шляхи корекції складу мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору, реалізувавши при цьому ряд завдань.

Результати роботи базуються на достатньо репрезентативній кількості експериментальних досліджень, клінічних спостережень. Автор використав сучасні високоінформативні та надійно апробовані в науці і практиці електронно-мікроскопічні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, імунологічні, клініко-лабораторні, цитологічні, гістоморфологічні та інформаційно-аналітичні методи дослідження. Достатній обсяг експериментів і спостережень, проведена статистична обробка результатів дозволяють підтвердити адекватність і достовірність зроблених автором висновків, які відповідають меті та поставленим завданням.

Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів.

Дисертант в своїй роботі наводить низку нових даних, які об'єднують наші знання про мікробіом, віром та організм людини в умовах патології. Ним вперше було досліджено ступінь інфікованості ентеровірусами осіб з дисбіозом кишківника, з позакишковою патологією, синдромом набутого імунодефіциту. Вперше вивчено питання присутності F-специфічних коліфагів у зразках фекалій, отриманих від людей, в тому числі і з дисбіотичними розладами.

Вперше показано зростання частоти реєстрації антигенів вірусів Норфолк в осіб з дисбіозом. Дисертант вперше вивчив генетичні маркери вірулентності ентеровірусів, виділених від людей з дисбіозом, в тому числі і від хворих з імунодефіцитом. З метою виділення ентеровірусів з фекалій хворих з дисбіозом при наявності кишкової патології, позакишкової, хворих з імунодефіцитом був проведений скринінг оптимального набору культур клітин. Дослідником розроблено метод використання плівок підложок, оброблених бентонітом для електронної мікроскопії. Метод виявився більш чутливим для електронно-мікроскопічної діагностики вірусних захворювань. Дисертантом особисто розроблена модель дисбіозу з використанням комплексу антимікробних засобів: антибіотиків ампіциліну та метронідазолу з додаванням антисептику декаметоксину, який потенціює дію антибіотиків.

В досліджах на тваринах з індукованим дисбіозом виявлена здатність монопробіотичних та мультипробіотичних препаратів викликати скорочення тривалості виділення вірусів поліомієліту. Вдосконалено спосіб одержання

гелю бентоніту для медичних цілей, а також виявлена позитивна дія його на деякі фізіологічні показники життєдіяльності експериментальних мишей. Обґрунтовано використання сорбентів для профілактики дисбіозу при вірусній інфекції.

Вперше виявлено і описано цитодеструктивні зміни епітелію кишківника у експериментальних тварин при формуванні дисбіозу та описано формування вогнищ апоптозу в кишківнику мишей при асоціації дисбіозу з вірусним чи вірусно-бактеріальним інфекційним процесом. Вперше виявлено, що при пероральному вживанні сорбентів на основі гелю бентоніту та гідрогелю метилкремнієвої кислоти під час антибіотикоіндукованого дисбіозу в комплексі з ентеровірусною інфекцією зменшується термін виділення вірусів з кишківника експериментальних тварин. Автором встановлено здатність пробіотиків та сорбентів суттєво зменшувати цитодеструктивні процеси в кишківнику та паренхіматозних органах, які розвиваються на фоні дисбіозу

Основні наукові положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на численних наукових вітчизняних і міжнародних з'їздах, конференціях.

Повнота викладу матеріалів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи відображені у 39 опублікованих наукових працях, зокрема, 24 – у фахових наукових виданнях, які рекомендовані МОН України, 2 в журналах міжнародних наукометричних баз (Web of Science та Scopus); 1 – в іноземному фаховому науковому журналі, 10 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій, отримано 1 патент України на корисну модель, зроблено 1 галузеве нововведення.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 370 сторінках друкованого тексту, з них 271 становить основний текст; складається зі вступу, дев'яти розділів, аналізу й узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 85 рисунками, 41 таблицею. Список використаних джерел складається з 382 найменувань, 205 із яких – кирилицею, 177– латиницею.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності. Дисертаційна робота Бобиря В.В. «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів» написана

грамотним діловим стилем літературної української мови. Окремі фразеологічні неточності не зменшують наукову і практичну значущість дисертаційної роботи. Результати роботи викладені за загальноприйнятим для дисертаційних робіт планом.

Вступ містить обґрунтування актуальності теми дослідження. Лаконічно і чітко визначено мету дослідження. Автор акцентує увагу на з'ясуванні ролі вірусних популяцій в функціонуванні організму людини та їх взаємовідносини з іншими представниками мікробіому.

Метою роботи було з'ясування ролі ентеровірусів у розвитку порушень кишкового мікробіоценозу та наукове обґрунтування шляхів корекції складу нормальної мікрофлори кишківника з урахуванням впливу вірому. Для досягнення поставленої мети дослідником поставлено 6 завдань. Автором докладно викладено новизну і практичну значимість роботи та особистий внесок дисертанта у виконання досліджень. Зауважень відносно матеріалів, викладених у вступі немає.

Перший розділ дисертації називається «Сучасні погляди на проблему дисбіотичних порушень та роль вірусного фактору у цьому процесі» (огляд літератури) складається з чотирьох підрозділів. В першому підрозділі глибоко аналізується проблема дисбіозу як хвороби сучасної цивілізації, з'ясовуються причини, наслідки та шляхи вирішення. Закінчуючи цей підрозділ автор звертає увагу на постійне зростання засобів для корекції і відновлення нормальної мікрофлори людини.

В цьому розділі дисертант також описує сучасний стан вивчення питання людського вірому як компоненту мікробіому. Увага автора до вірому не є безпідставною. Не зважаючи на обмеження інформації, автор аналізує з сучасних позицій і саме явище вірому, і його можливий склад, і ті компоненти, які на сьогодні вже вивчені. Надалі дисертант аналізує взаємодію вірому та мікрофлори людини. І хоч вірусно-бактеріологічні асоціації не є новими в медичній мікробіології, та автор знаходить нові аспекти цієї взаємодії.

І останній підрозділ – це аналіз шляхів і підходів до моделювання дисбіотичних порушень у лабораторних тварин. Описуються різні способи моделювання дисбіозу у лабораторних тварин та надаються певні

рекомендації щодо нормалізації порушеної мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору

У другому розділі «Матеріали і методи дослідження» достатньо повно описані використані матеріали та методики. Розділ за своїм змістом відповідає виконаним автором експериментам, засвідчує високий методичний рівень роботи.

Розділ 3 є важливим для всієї роботи. В ньому дисертант наводить результати власних досліджень з визначення присутності цитопатогенних агентів у зразках, отриманих від осіб з дисбіозом, а також аналізує та порівнює видовий склад ентеровірусних ізолятів. Автору вдалось зафіксувати зростання частоти реєстрації цитопатогенних агентів в осіб з бактеріологічно підтвердженими дисбіотичними розладами, в порівнянні з особами з не порушеною мікрофлорою кишківника. Крім цього у даному розділі наведені результати виявлення інших кишкових вірусів у осіб з дисбіозами (коліфагів, вірусу Норфолк). Автор звертає увагу на перспективність вивчення норовірусної інфекції в нашій країні.

В розділі 4 автором наведені результати генотипової та фенотипової характеристики ентеровірусних ізолятів від осіб з дисбіозами. Автор чітко сформулював мету дослідження: встановлення можливого зв'язку частоти реєстрації однакових маркерів з формулюванням дисбіотичних порушень. З-поміж наведених різних маркерів було відібрано три найбільш показових та достовірних щодо оцінки вірулентності. Усі одержані ізоляти поліовірусів були віднесені до авірулентних, в той час як у клінічних ізолятів вірусів Коксакі і нетипованих ентеровірусів, виіслених від осіб з дисбіозом, зростала частина позитивних маркерів вірулентності. Автором також описано фенотипові характеристики нетипованих ентеровірусів отриманих від осіб з дисбіозом. Для більшості з них характерним був низький афінитет до бентоніту (маркер $A_{\text{бент}^-}$), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S+) та позитивний маркер rct₄₀. Це дає підстави рекомендувати визначення генетичних маркерів для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених від людей з порушеним мікробіомом кишківника.

Розділ 5 присвячений вивченню особливостей ізоляції та електронно-мікроскопічної верифікації ентеровірусів від осіб з дисбіозом.

Дисертант вважає що вірусологічний метод залишається надійним і ефективним способом діагностики вірусних інфекцій, оскільки він не лише дозволяє виділити віруси з матеріалу, але й вивчити їх біологічні властивості. Однак і на сьогодні залишаються не вирішені або частково не вирішені питання. Тому першим, і на наш погляд, важливим етапом став вибір культур клітин для виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу. Автор вивчив чутливість ряду перещеплювальних культур клітин різного походження: встановив, що найбільшу чутливість виявили HEp-2 та L20B.

Наступним етапом стала порівняльна оцінка методів концентрування ентеровірусів для проведення електронно-мікроскопічної верифікації. Результати досліджень засвідчили найбільш високу ефективність використання бентоніту. Від осіб з дисбіозом були виділені і верифіковані електронно-мікроскопічними дослідженнями ентеровіруси. Ці методи мають першочергове значення для верифікації нетипованих ентеровірусів, доля і значення яких залишаються поки що остаточно не з'ясованими.

Розділ 6 містить матеріали, в яких наведена порівняльна оцінка способів моделювання дисбіозів у лабораторних тварин. Результатом цих досліджень стала розробка оригінального способу формування дисбіозу у лабораторних тварин. Крім того дослідником вивчено можливість моделювання ентеровірусних інфекцій у таких тварин, що дозволило виявити вплив дисбіозу на перебіг ентеровірусної інфекції та вивчити динаміку виділення ентеровірусів від таких тварин.

В розділі 7 представлені матеріали, в яких йдеться про структурно-морфологічні зміни у кишківнику тварин після формування експериментального антибіотикоіндукованого дисбіозу та зміни у внутрішніх органах при вірусних і вірусно-бактеріальних процесах, що розвиваються на фоні порушень мікробіоценозу кишківника. Дисертантом встановлено, що дисбіоз є не лише порушенням кількісного та якісного складу нормальної мікрофлори кишківника, а призводить до виражених ультраструктурних порушень у внутрішніх органах тварин. Крім описаної морфологічної картини

антибіотикоіндукованого дисбіозу кишківника, автором встановлено здатність ентеровірусів ініціювати апоптозні процеси у внутрішніх органах експериментальних тварин.

Розділ 8 містить матеріали, які з наукової точки зору доводять ефективність використання сорбентів для регуляції мікробіому кишківника. Автором отримано важливі результати щодо впливу ентеросорбентів бентоніту та гідрогелю метилкремнієвої кислоти на тривалість виділення ентеровірусів у мишей зі збереженою мікрофлорою та зі сформованим дисбіозом. Також, окремо було показано позитивний вплив гелевої форми бентоніту в цілому на фізіологічні показники лабораторних тварин.

В розділі 9 дисертант дає експериментальне обґрунтування ефективності використання пробіотиків та сорбентів для профілактики структурно-морфологічних порушень при дисбіозі кишківника. На першому етапі вивчалась роль сорбентів та пробіотиків у профілактиці структурно-морфологічних порушень у внутрішніх органах при дисбіозі, а на другому етапі ці ж зміни у тварин з дисбіозом, але інфікованих ентеровірусами та вірусно-бактеріальними інфекціям. Було виявлено, що після використання пробіотиків у слизовій кишківника відмічалось згасання цитодеструктивних процесів. Дисертант робить важливий, з нашої точки зору висновок, що сорбенти в цілому не лише нормалізують морфологічний та фізіологічний стан кишківника, а й сприяють збереженню ультраструктурної організації печінки та нормалізують певним чином її метаболізм.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» автор узагальнює результати проведених експериментальних досліджень. При цьому проводиться глибокий аналіз кожного з етапів та по можливості порівнюються власні результати з дослідженнями інших авторів.

Висновки дисертаційної роботи сформульовано у відповідності з отриманими результатами. Вони відповідають поставленим завданням, логічні та науково обґрунтовані.

На загал дисертаційна робота виконана на великому обсязі обстежених залучених зразків (740). При проведенні дослідів використовувалися контрольні зразки, формувалися контрольні групи, що дало змогу одержати

достовірні результати. Достовірність даних була також забезпечена використанням статистичних методик і встановленням відповідних коефіцієнтів. Достовірності наданих результатів сприяє і велика кількість оригінальних фото. Методичний рівень виконання дисертації відповідає сучасним вимогам медичної науки. Робота має значну практичну значимість, про що свідчать надані акти впровадження результатів НДР та видані патенти. Результати дисертаційної роботи широко оприлюднені у статтях, виступах та тезах наукових конференцій різного рівня.

Ідентичність змісту автореферату і основних положень дисертації.

Автореферат дисертації оформлений відповідно до вимог МОН України, його структура та зміст відповідають основним положенням дисертації.

В процесі ознайомлення з роботою виникли деякі зауваження, а саме:

1) в тесті роботи є декілька стилістичних помилок; 2) огляд літератури описаний дуже ретельно, але його переобтяжено обширним списком наукових публікацій, який можна було б скоротити; 3). В розділі «Матеріали та методи» дисертант описує методику культивування вірусів Коксакі В у новонароджених мишах, проте в матеріалах експериментальних розділів таку модель не використовує. 3) частину матеріалу, яку відображено у експериментальних розділах, можна би було б перенести в розділ «Матеріали і методи».

Наведені вище зауваження не заперечують науково-практичної значущості роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи Бобиря В.В.

У порядку наукової дискусії хотілося б отримати відповіді автора на наступні запитання:

1. Якими критеріями керувався дисертант при виборі пробіотичних мікробних штамів та мікроорганізмів в складі мультипробіотичного препарату, які він використовував для профілактики структурно-морфологічних порушень при експериментальному дисбіозі?

2. Дослідником науково обґрунтовано гіпотезу про спроможність ентеровірусів ініціювати виражені апоптозні процеси в тонкому кишківнику. Яка ваша думка: явище апоптозу в умовах дисбіотичних порушень відіграє позитивну чи негативну роль?

3. Чому об'єктом для проведення електронно-мікроскопічних досліджень вами було обрано в першу чергу тонкий кишківник, адже відомо, що основні дисбіотичних порушення відбуваються у товстому кишківнику?

Висновок. Дисертаційна робота Бобиря В.В. «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів» є закінченим науковим дослідженням, яке присвячене вирішенню важливої наукової проблеми – з'ясуванню ролі ентеровірусів у розвитку порушень кишкового мікробіоценозу та науковому обґрунтуванню шляхів корекції складу нормальної мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору.

За своєю актуальністю, об'ємом досліджень і науково-методичним підходом, науковою новизною отриманих результатів, теоретичною та практичною цінністю дисертаційна робота відповідає вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567 (із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015, № 567 від 27.07.2016) щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук, а її автор Бобир В.В. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.06 вірусологія.

**Офіційний опонент,
завідувач кафедри вірусології
Національного університету
охорони здоров'я України
імені П. Л. Шупика
доктор медичних наук,
професор**



[Handwritten signature] Дзюблик І.В.

[Handwritten signature]
Завідувач

[Handwritten signature] В. Різачук
[Handwritten signature]