

ВІДГУК

офіційного опонента, завідувача кафедри мікробіології, вірусології та імунології доктора медичних наук, професора Климнюка С.І. на дисертаційну роботу

Бобиря В.В. «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 дослідження. Останніми роками помітно зріс інтерес до вивчення мікробіому людини. Отримано важливі данні про роль його роль у формуванні здоров'я людини. Є переконливі доказів того, що мікробіом впливає на всі процеси людського організму. Деякі вчені відводять мікробіому роль додаткового орган людини, який бере участь у травленні, управлінні метаболічними процесами, підтримці цілісності епітеліального бар'єру, формуванні колонізаційної резистентності, знешкодженні токсинів, відіграє морфокінетичну та низку інших фізіологічних функцій. І це не дивно, адже чисельність мікроорганізмів на один- 2 порядки перевищує число власних клітин людського тіла

Протягом тривалого періоду основні пошуки науковців були направлені на пізнання бактеріального компоненту мікробіому, однак не менше цікавою є його вірусна складова– віром. Людський віром суттєво менш вивчений порівняно з бактеріальною мікрофлорою, проте сьогодні спостерігається активізація досліджень галузі знань. Понад 80% вірусів, виявлених за останні роки в товстій кишці людини, раніше були просто невідомі. Отже, вкрай постала доцільність і необхідність вивчення вірому людини, як важливого компоненту людського мікробіому.

На сьогодні ми продовжуємо проявляти зацікавленість , тому що бачимо необхідність вдосконалення існуючих підходів до корекції дисбіотичних

порушень і розробці нових, більш ефективних. Чільне місце в такому пошуку посідає, запропонована на моделі тварин з дисбіозом, інфікованих вірусними та вірусно-бактеріальними інфекціями, концепція використання ентеросорбентів має перспективне значення. Без сумніву, якщо проблеми вірусно-бактеріальних асоціації вивчаються доволі інтенсивно, то ідея моделювання патогенного впливу таких асоціацій на тваринах із сформованим дисбіозом є новою. Враховуючи, що шлунково-кишковий тракт однією з найскладніших мікробних екосистем, подальші дослідження в даному напрямку можуть відкрити нові можливості для лікування інфекційних захворювань.

Тому тему дисертаційного дослідження Бобиря В.В., присвячену вирішенню важливої науково-практичної проблеми сучасної вірусології – ролі ентеровірусів у структурі порушень кишкового мікробіому та науковому обґрунтуванні нових підходів до корекції складу нормофлори кишки, враховуючи вірусні складові, слід визнати вкрай актуальною, тому що такий підхід має вкрай важливе значення для медичної науки і практики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана відповідно до затверджених МОЗ України тематичних планів наукових досліджень кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця: «Ентеровіруси. Дисоціація: теоретичні аспекти, практичне значення. Циркуляція ентеровірусів у регіонах України. Роль в інфекційній патології людини. Удосконалення методів діагностики та профілактики ентеровірусних інфекцій; «Закономірності звільнення стічних вод м. Києва від ентеровірусів на Бортницькій станції аерації»; «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів», (автор – відповідальний виконавець). У роботу також увійшли результати, одержані при виконанні держбюджетної теми «Вивчення особливостей ентеровірусів у хворих з ВІЛ-інфекцією», (автор – відповідальний виконавець).

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень, висновків

і рекомендацій, які сформульовані в дисертації, їх достовірність. Автор поставив за мету з'ясувати роль ентеровірусів у розвитку порушень кишкового мікробіому та науково обґрунтувати шляхи корекції складу мікрофлори кишки 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, фізико-хімічні та інформаційно-аналітичні методи дослідження. Окремо слід зазначити достатній обсяг проведених експериментів, і спостережень, яким адекватно проведена статистична обробка результатів дозволяє підтвердити достовірність зроблених автором висновків, які відповідають меті та поставленим завданням.

Наукова новизна. В роботі Бобиря В.В. вперше описано взаємодію вірому та бактеріального мікробіому кишки в умовах дисбіозу. Вивчено ступінь інфікованості ентеровірусами осіб з дисбіозом кишки, в тому числі і тих, що мають імунодефіцитами. Науково обґрунтовано домінування вірусів поліомієліту в загальній структурі ентеровірусів, ізольованих від таких хворих. На підставі вірусологічних та молекулярно-генетичних досліджень фекальних мас здорових осіб і людей з дисбіозом встановлено закономірну присутність у них ентеровірусів. Крім того, експериментально доведено збільшення частоти виявлення вірусів Норфолк в осіб з дисбіозом, а також вперше досліджено присутність коліфагів у зразках фекалій, отриманих від різних категорій осіб, в тому числі тих, хто має дисбіоз.

Вивчено генетичні маркери вірулентності ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом та доведено, що ізоляти вірусів поліомієліту, виділені як від здорових, так і від осіб з дисбіозом, мають маркери, характерні для авірулентних штамів, що свідчить про їх вакцинну природу. Разом з тим, доведено зростання частоти реєстрації позитивних маркерів вірулентності у

вірусів Коксакі В та нетипованих штамів ентеровірусів, виділених від осіб з порушеним мікробіоценозом кишки.

Вперше показано, що дисбіотичні стани супроводжуються вираженими цитодеструктивними порушеннями епітелію тонкої кишки. Сформульовано наукову гіпотезу про спроможність ентеровірусів ініціювати виражені апоптозні процеси в тонкій кишці. Встановлено можливість дисбіотичних станів сприяти розвитку асоційованих вірусно-бактеріальних інфекцій у тварин. Таке моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на тлі порушення складу мікробіому кишки дозволило довести наявність виражених дегенеративних змін у внутрішніх органах тварин, які особливо проявлялись у печінці, набуваючи генералізованого характеру.

Вперше вивчено питання поширеності вірусів Норфолк (родина Caliciviridae, рід Norovirus) в осіб з дисбіозом. Отримані результати доводять необхідність глибокого вивчення поширення норовірусної інфекції в нашій країні, особливо серед дітей. Досліджено присутність F-специфічних колифагів у зразках фекалій, отриманих від людей, в тому числі і з дисбіозами. Експериментальними дослідженнями вперше обґрунтували доцільність використання сорбентів для профілактики дисбіозу в тварин з урахуванням вірусного фактору.

Практичне значення дисертаційної роботи Бобиря В.В. полягає у тому, що автором вдосконалено спосіб приготування гелю бентоніту для медичних потреб, який дозволяє підвищити вологоутримуючу здатність цього сорбенту, його сорбційні властивості, в тому числі і для ентеровірусів, а також ступінь очищення та диспергування. Виявлено здатність гелю бентоніту при пероральному вживанні тваринами з антибіотикоіндукованим дисбіозом зменшувати тривалість виділення та інфекційну активність ентеровірусів. При моделюванні вірусно-бактеріальних інфекцій на тваринах встановлено наявність гепатопротекторних властивостей сорбентів на основі монтморилоніту .

Бобиром В.В. показана доцільність одночасного визначення як

ентеровірусного геному в матеріалі, отриманому від хворих, так і виділення вірусних інфекційних агентів у культурах клітин. Проведений порівняльний аналіз методів концентрації ентеровірусів для електронно-мікроскопічної індикації дозволив рекомендувати спосіб концентрації бентонітом як основний, який дає можливість не лише отримати висококонцентровані препарати, але й очистити вірусні часточки в процесі їх концентрації. Крім того, запропонований оригінальний спосіб електронно-мікроскопічної індикації клінічних ізолятів ентеровірусів у матеріалі з їх низьким титром, дозволив дослідити структурно-морфологічні особливості нетипованих штамів ентеровірусів.

Автором розроблено спосіб моделювання дисбіозу у лабораторних тварин (мишей) шляхом використання комбінації антибіотиків ампіциліну і метронідазолу та доведено ефективність застосування антисептика декаметоксину для потенціювання дії антибіотиків під час створення моделі таких процесів.

Цікавими і важливими для практичної медицини є дослідження автора, направлені на експериментальне обґрунтування здатності живих мультипробіотиків на основі біфідобактерій, лактобактерій та ін. скорочувати тривалість виділення ентеровірусів у тварин в експерименті, а також сприяти тонкої кишки мишей.

Одержані результати наукових досліджень впроваджено в роботу клініко-діагностичної лабораторії КНП «Тернопільської університетської лікарні», в навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України; лікувально-профілактичну та наукову роботу ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського» НАМН України; кафедри мікробіології та вірусології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет МОЗ України»; кафедри мікробіології, вірусології та імунології з курсом інфекційних хвороб медичного факультету Ужгородського національного університету МОН України;

кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова МОЗ України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології імені Д.П. Гриньова Харківського національного медичного університету МОЗ України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Дніпропетровської медичної академії; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Основні висновки сформульовані в окремому розділі «Віром людини» Національного підручника для студентів ВМНЗ 3-4 рівня акредитації «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» (2020).

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на численних наукових вітчизняних і зарубіжних конгресах з'їздах, конференціях.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

Основні результати дисертаційної роботи відображено в 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 в додатків. Робота ілюстрована 85 рисунками, 41 таблицею. Список використаних джерел складається з 382 найменувань, 205 з яких – кирилицею, 177 латиницею.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності. У вступі обґрунтована актуальність обраної теми, визначена мета дослідження та завдання для її реалізації.

В огляді літератури автор чітко і глибоко, показавши уміння та ерудицію при роботі з літературою, описав результати досліджень вітчизняних і зарубіжних науковців. Розділ містить значний науковий матеріал, представляє розгорнутий виклад функцій симбіотичної мікрофлори людини, зокрема, її роль у підтриманні здоров'я людини. Автором ретельно проаналізовано нові підходи до профілактики та корекції порушень мікробіоценозу, охарактеризовано сучасний стан проблеми вивчення вірому та описано особливості його взаємодії з іншими представниками мікробіоти людини. Цей розділ дає уявлення про актуальність проблеми та завдань, які потребують свого розв'язання.

Розділ «Матеріали та методи дослідження» за своїм змістом відповідає виконаним автором експериментам, засвідчує високий методичний рівень роботи. Дисертант ретельно описує використані методики експериментів, що надає повну уяву про методичні підходи автора при виконанні завдань. Статистичну обробку результатів виконано за допомогою пакетів сучасних програм.

Виклад результатів власних досліджень представлено у восьми розділах, які послідовно розкривають поставлену мету і задачі.

Третій розділ автор присвячує вивченню закономірності поширення цитопатогенних агентів та ентеровірусів у різних категорій людей, в тому числі з дисбіотичними розладами. Виявлено зростання частоти виділення ентеровірусів у осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори кишки. Вивчено питання присутності F-специфічних коліфагів у зразках фекалій, отриманих від людей з дисбіозом, а також вперше досліджено інфікованість людей порушеним мікробіоценозом кишки вірусами Норфолк.

У четвертому розділі представлені результати досліджень генотипових та фенотипових характеристик ентеровірусних ізолятів від осіб з

дисбіотичними розладами. Дослідник описав фенотипові характеристики нетипованих ентеровірусів отриманих від осіб з дисбіозом, визначивши, що для більшості з них характерний низький афінітет до бентоніту (маркер $A_{\text{бент}}^-$), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S+) та позитивний маркер gct_{40} .

Дисертантом доведено, що порівняно із штамми від осіб з нормоценозом кишки, виділені при дисбіотичних зрушеннях ізоляти вірусів Коксакі В і нетипованих ентеровірусів характеризуються збільшенням частоти позитивних маркерів вірулентності ($A_{\text{бент}}$, S+ та gct^{40}), а також зростанням тривалості збереження інфекційності, що опосередковано може свідчити про їх підвищену вірулентність.

П'ятий розділ висвітлює систему, присвячену розробці методичних підходів до ізоляції ентеровірусів з клінічного матеріалу, зокрема, від людей з дисбіозом. Дослідник порівняв чутливість низки перещеплюваних культур клітин. За результатами досліджень встановлено, що інтенсивність розвитку та глибина прояву ЦПД залежить як від виду виділених вірусних агентів, так і від типу культур клітин, на яких проводилась їх ізоляція. Автор порівняв та оцінив ефективність способів концентрування клінічних ізолятів ентеровірусів. Розроблено і апробовано спосіб електронно-мікроскопічної індикації клінічних ізолятів ентеровірусів безпосередньо у матеріалі, що дало змогу порівняти морфологію нетипованих штамів ентеровірусів, виділених від різних категорій осіб, в тому числі і від осіб з дисбіотичними порушеннями.

Без сумніву важливими є результати шостого розділу, в якому автор вивчає вплив дисбіотичних порушень на розвиток ентеровірусних інфекцій у мишей. Спочатку ним порівняно та оцінено способи формування дисбіозу та показано, що найвираженіші порушення мікробіоценозу кишки формуються в результаті використання комбінації ампіциліну та метронідазолу. Цікавим є підхід до моделювання антибіотикоіндукованого дисбіозу у тварин із додаванням у поїлку декаметоксину.

Автором виявлено здатність деяких живих монопробіотичних, а також мультипробіотичних штамів скорочувати тривалість виділення вірусів поліомієліту від тварин з непорушеним мікробіоценозом кишки. Разом з тим, результати досліджень впливу кишкової мікрофлори тварин на тривалість збереження інфекційності вірусів в умовах *in vivo* свідчать про те, що змодельовані на тваринах дисбіотичні порушення сприяють зростанню швидкості елімінації ентеровірусів з організму.

У цьому розділі описано структурно-морфологічні зміни внутрішніх органів (тонкої кишки, селезінки, печінки) тварин при вірусних і вірусно-бактеріальних інфекціях, які формуються на фоні експериментального дисбіозу. Вперше встановлено активізацію імунних процесів, що супроводжує формування дисбіозу. З використанням електронної мікроскопії на ультраструктурному рівні дослідником доведено здатність ентеровірусів і вірусно-бактеріальних асоціацій поглиблювати структурно-морфологічні зміни у внутрішніх органах тварин, які розвиваються на фоні дисбіотичних розладів.

Розділ 8 присвячений науковому обґрунтуванню використання сорбентів для регуляції мікробіому кишки. Автором доведено здатність сорбенту на основі гелевої форми бентоніту знижувати концентрацію ентеровірусів у виділеннях тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом. Крім того, показано, що використання даного ентеросорбенту має позитивний вплив на організм дослідних тварин, що виражається в першу чергу у зменшенні їх летальності, а також інших показниках.

Важливим розділом є дев'ятий, в якому автор ретельно обґрунтовує здатність пробіотичних препаратів та сорбентів сприяти зменшенню глибини цитодеструктивних порушень при моделюванні вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу та нормалізації імунних реакцій організму, які супроводжують розвиток таких процесів. Дослідником переконливо показано, що профілактичний ефект пробіотиків більш виражений у кишці, а сорбентів – на рівні структурної організації печінки.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» докладно і доказово пояснюючи, автор підводить підсумок представлених у роботі результатів дослідження, обґрунтовує найважливіші факти і положення. Дисертант досить вдало проводить аналіз отриманих результатів у вигляді порівняння основних етапів наукового пошуку. Автор узагальнює одержані результати і патогенетично обґрунтовує доцільність застосування ентеросорбентів на основі гелю бентоніту для корекції дисбіотичних порушень і робить відповідні змістовні висновки.

Висновки, які наведені в дисертації, повністю відображають зміст роботи. Вони зроблені на основі визначення їх статистичної вірогідності. Висновки відповідають завданням дослідження та свідчать про досягнення поставленої мети.

Як і в будь-якій роботі такого плану в ній є певні недоліки:

- недоцільно описувати детально виділення РНК, ампліфікацію та інші відомі генетичні методи;

- недоцільно детально описувати методику постановки реакції титрування, вірусної нейтралізації ?

- у списку скорочень є зайві скорочення – МОЗ, МОН;

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

1. В чому особливість запропонованого Вами способу отримання гелю бентоніту з медичною метою та і якого походження сировину Ви використовували для отримання гелевої форми бентоніту?

2. Ви повідомляєте про активізацію імунних процесів, які спостерігаються на фоні формування дисбіотичних порушень, спираючись на електронно-мікроскопічний аналіз структурно-морфологічних особливостей клітин Панета, плазматичних клітин, еозинофілів і базофілів та ін. Чи проводили ви додаткові дослідження, направлені на ідентифікацію зазначених клітин імунної системи?

3. Як Ви можете пояснити причини зростання частоти реєстрації вірусів Норфолк у осіб з дисбіотичними порушеннями?

Викладені зауваження запитання не носять принципового характеру і не знижують наукової і практичної цінності дисертації у цілому, а також розроблених автором основних наукових положень та висновків.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації в практиці

Отримані автором результати дисертаційного дослідження мікробіологічно обґрунтовують доцільність комбінованого застосування декаметоксину та фторхінолонів для підвищення ефективності профілактики розвитку післяопераційних інфекційних ускладнень в клінічній практиці відділень мікрохірургії ока. Важливе значення мають нові наукові дані для їх широкого використання в програмах лекцій вищих медичних навчальних закладів і закладів післядипломної освіти.

Дані про відсутність порушень академічної доброчесності

Розглянувши матеріали дисертації здобувача наукового ступеня доктора медичних наук Бобиря Віталія Васильовича «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів» встановлено, що при комп'ютерному тестуванні електронної форми дисертації та наявних за її темою публікацій за допомогою системи «Strike Plagiarism» академічного плагіату в наданих матеріалах дисертації не виявлено. Текст представлених матеріалів дисертації Бобиря Віталія Васильовича є оригінальним: всі матеріали, що цитати правильно і коректно позначені та відображені в списку літератури, всі текстові співпадіння мають відповідні посилання на першоджерело, що міститься в списку використаних робіт. Отже, дисертаційну роботу слід визнати самостійною науковою працею.

Висновок. Дисертаційна робота Бобиря В.В. «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів» є самостійною завершеною науково-дослідною роботою, в якій наведене нове вирішення наукової проблеми –

науковому обґрунтовані нових підходів до корекції складу нормальної мікрофлори кишки з врахуванням 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 мікробіології,
 вірусології та імунології
 Тернопільського національного
 медичного університету
 ім. І.Я.Горбачевського МОЗ України,
 доктор медичних наук, професор



С.І. Климнюк

Особистий підпис

Заступник ректора з кадрових питань
 Тернопільського національного
 медичного університету


