

**В І Д Г У К**  
**офіційного опонента на дисертаційну роботу**  
**МОШИНЕЦЬ ОЛЕНИ ВОЛОДИМИРІВНИ**  
**«БІОТЕХНОЛОГІЧНІ І СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ**  
**ОСОБЛИВОСТІ І КЛІНІЧНІ АСПЕКТИ**  
**БІОПЛІВОК ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ»,**  
**представлену на здобуття ступеня доктора біологічних наук**  
**(за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія (біологічні науки)).**

**Актуальність дисертаційної роботи.**

Акцентуючи увагу на актуальності цієї дисертаційної роботи, по-перше необхідно підкреслити її фундаментальний аспект. Наразі ми усвідомлюємо, що біоплівку треба розглядати як конгломерат мікроорганізмів, розташованих на будь-якій поверхні, клітини яких прикріплені одна до одної. Отже, по-суті, біоплівка - це співтовариство (колонія) мікроорганізмів, яке має просторову та метаболічну організацію, що розташоване на поверхні розділу середовищ і занурене в позаклітинний полімерний матрикс. Утворення біоплівки починається з прикріплення вільно плаваючих мікроорганізмів – «перших колоністів» до поверхні (завдяки слабким Ван-дер-Ваальсовим взаємодіям?). Втім, потім багато мікроорганізмів прикріпляються до поверхні міцніше за рахунок призначених для цього позаклітинних структур, наприклад, ворсинок пилу. Зазвичай мікроорганізми занурені в позаклітинну полімерну речовину (позаклітинний матрикс), що виділяється ними - слиз. Вважається, що 95-99 % усіх мікроорганізмів у природному середовищі існують у вигляді біоплівки. Але є один суттєвий аспект. На теперішній час нам не все зрозуміло у випадку властивостей і поведінки системи «Мікроорганізми – Біоплівка - Поверхня». Наприклад, актуальними є наступні питання: - як формуються мікробні біоплівки (біологічний, фізико-хімічний, в тому числі й енергетичний, аспекти)?; – що відомо за фактори, які підвищують ймовірність формування мікробної біоплівки?; – яким чином можна запобігти формуванню мікробної біоплівки?; – діагностика мікробної біоплівки; - методи лікування мікробної біоплівки. Тому в цілому принципове значення має подальше з'ясування біологічних закономірностей та фізико-хімічних механізмів формування біоплівки як на «неживих» (каміння, металеві конструкції, пластики) поверхнях, так і на поверхнях живого організму (стілки кишечника та інших внутрішніх органів, зуби тощо).

По-друге є очевидним й суто практичний аспект проблеми. Є вагомі підстави стверджувати, що до 80 % бактеріальних інфекцій, що вражають людей, спричинені полімікробними біоплівками. Отже, феномен біоплівки має дуже велике значення для терапії інфекційного процесу. Дійсно, біоплівки суттєво знижують діапазон використання ефективних антибіотиків серед тих, які виявили ефективність у класичних мікробіологічних тестах. Окрім того, вкрай важливо підкреслити, що біоплівки як форма колонізації поверхонь, зокрема, і критичних поверхонь, є суттєвими для реалізації сучасних технологічних процесів. Наприклад, мова йде за захист поверхонь металів, в тому числі і вкритих фарбами, та різноманітних пластиків, зокрема пластиків медичного призначення. Очевидно, що в цілому ж це все є важливим напрямом розвитку не лише сучасної біотехнології, але й матеріалознавства.

Отже, важливим у фундаментальному (науково-теоретичному) та прикладному (практичному) аспектах є подальше вивчення закономірностей формування та властивостей біоплівки, здійснення аналізу, систематизації та проведення узагальнення сучасних знань про них.

Але є ще один цікавий (в методологічному відношенні) аспект зазначеної дисертаційної роботи – міждисциплінарний! Адже біоплівки формуються, як вже було підкреслено вище, на поверхні розділу, властивої для біологічної чи абіогенної системи. Іншими словами, мова йде за біологічні та біофізикохімічні процеси на межі розділу фаз. А це вже – суперпозиція наших уявлень, які потребують залучення знань у галузі не лише мікробіології, але й біофізичної хімії, хімії та фізики поверхні, біомедицини та біотехнології. І якщо дивитися на цю дисертацію під таким кутом її бачення (а опонент саме таке намагається зробити!), то можна стверджувати, що сама постановка питання щодо міждисциплінарного проведення відповідного наукового пошуку є не просто цікавою, а надзвичайно цікавою!

Ось чому дисертаційна робота Мошинець Олени Володимирівни, що присвячена ґрунтовному вивченню структурно-функціональних особливостей існування біоплівки грамнегативних бактерій, у тому числі й з наголосом на відповідному клінічному аспекті, є, безперечно актуальною як у фундаментальному, так і в прикладному відношенні; для мене це є цілком очевидним.

Перед тим, як написати цей Відгук, опонент:

1. Прочитав дисертацію та її автореферат;
2. Ознайомився з вибраними публікаціями дисертантки (читав відбитки, що додаються до тексту роботи, авторських статей в оригіналі);
3. Мав з нею особисті зустрічі, під час якої Олена Володимирівна надала мені додаткові роз'яснення щодо окремих результатів своєї роботи, які викликали в мене запитання.

Нарешті, опонент сподівається, що під час захисту роботи дисертантка виступить з цікавою змістовною науковою доповіддю на засіданні спеціалізованої Вченої ради.

На підставі вищезазначеного формую своє враження від дисертаційної роботи О.В. Мошинець.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота за своєю структурою є достатньо канонічною і складається із класичних частин: *Перелік умовних скорочень; Вступ; Розділ 1. Огляд літератури; Розділ 2. Матеріали і методи досліджень; Експериментальна частина. Розділ 3. Структурні та екологічні особливості біоплівки грамнегативних бактерій; Розділ 4. Роль біоплівки у розвитку інфекційних ускладнень; Розділ 5. Роль біоплівки як джерела генів резистентності у госпітальному середовищі; Розділ 6. Біотехнології на основі біоплівки грамнегативних бактерій для вирішення завдань у агропромисловості; Висновки; Список літературних джерел; Додаток 1. Список публікацій здобувача; Перелік умовних скорочень.*

Я повинен відзначити, що фактичні дані, що наведені в роботі, чудово проілюстровані великою кількістю одиниць графічного матеріалу (рисунки, графіки, діаграми, таблиці, схеми, часто-густо вони виконані в кольорі). Всього маємо 142 рисунки і 21 таблицю відповідно до таких, що наведені в оригінальних друків

дисертанти. І я це активно вітаю, бо це сприяє кращому розумінню даних, що були одержані автором.

В цілому ж структура та обсяг дисертаційної роботи О.В.Мошинець уявляються мені цілком слушними.

**Ступінь обґрунтованості, достовірності наукових положень, висновків, рекомендацій.** Як на мене, то достовірність одержаних у роботі результатів забезпечена, перш за все, **використанням адекватних експериментальних підходів та методів**, а також надійною статистичною обробкою даних, що були накопичені при її виконанні.

Дійсно, в методичній частині дисертації ретельно описані експериментальні прийоми, які були задіяні при роботі з штамами бактерій та плазмідами, наголошено на умовах культивування, визначення антимікробної чутливості, методи отримання біоплівки, дослідження антибіоплівкових властивостей поверхонь та проведення комбінованого аналізу біоплівки, описано яким чином вивчали вплив антибіотиків на біоплівки і планктон, як досліджували вихід ДНК, як виділяли ДНК біоплівки. Ретельно описані підходи у випадку роботи з еукаріотичними культурами. Зокрема, мова йде за дослідження життєздатності еукаріотичних клітин після впливу антибіотиків, проведення аналізу прикріплення еукаріотичних клітин. Акцентується увага на використанні методу лазерної конфокальної скануючої мікроскопії. В методичному аспекті приділена увага полімеразній ланцюговій реакції, MALDI-TOF мас-спектрометрії для ідентифікації білків, скануючій і трансмісійній електронній мікроскопії. Описано метод виділення мембранних везикул. Охарактеризовано модель ранової поверхні. Наведено інформацію за біоциди, що були використані у роботі. Охарактеризовано, як провадилось дослідження поверхонь на здатність бактеріальної колонізації. Ретельно описано роботу з рослинами. І, нарешті, у цьому методичному розділі мова йде про біоінформаційний аналіз, молекулярний докінг-аналіз, статистичні методи, акцентовано увагу на етичних умовах проведення дослідів, відборі пацієнтів з періодонтитом.

Хочу підкреслити, що всі методичні прийоми та технології, які були задіяні при виконанні дисертаційної роботи, описані вельми ретельно (окрім того, звичайно, що всі вони грамотно, досконало та ґрунтовно були викладені у друках статей, які додаються до тексту роботи).

Наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані в текстах дисертації та її автореферату, практично повністю віддзеркалюють суть експериментальних результатів, одержаних автором.

Отже, в цілому опонент стверджує, що обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій, викладених в дисертаційній роботі, не викликає сумнівів. Запорукою цього твердження є, зокрема той факт, що експериментальні результати та концептуальні бачення дисертанти були попередньо надійно апробовані на сторінках авторитетних фахових журналів, які ретельно рецензуються.

**Повнота викладення результатів роботи в опублікованих працях.** Основні результати дисертації достатньо повно відображені у фахових наукових часописах, що ретельно рецензуються, а також апробовані на різноманітних вітчизняних і міжнародних спеціалізованих наукових форумах. Кількість авторських наукових праць, що розкривають основні наукові результати дисертації – 21, кількість публікацій, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації (на різноманітних наукових конференціях, симпозиумах, форумах в Україні, Данії,

Нідерландах, Іспанії, Німеччині, Португалії, Великій Британії, Ізраїлі, Австрії, Франції – 30.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Я б відзначив, перш за все, наступне.

По-суті, робота, хоча захищається у галузі біотехнології, є комплексною – вона має потужні як **фундаментальну**, так і **практичну**, а також суто **методичну** компоненти (мова йде за нові методичні розбудови).

Проаналізуємо це твердження більш ретельно. Хочу, перш за все, акцентував увагу на наступних блоках авторських пріоритетних експериментальних та концептуальних результатів, що були одержані при виконанні дисертації:

### **1. Фундаментальний аспект.**

Опонент стверджує, що в процесі виконання дисертаційної роботи були отримані нові знання щодо біотехнологічних і структурно-функціональних особливостей біоплівок деяких грамнегативних бактерій, зокрема умовно-патогенних і патогенних штамів. Так, були одержані нові знання щодо ролі целюлози в утворенні біоплівок. За допомогою власного нового високочутливого амілоїд-специфічного барвника AmyGreen дисертантка візуалізувала амілоїдні компоненти екзоклітинного матриксу в біоплівках. Я б відзначив й результати з вивчення ролі екзоклітинної ДНК і амілоїдогенезу у біоплівках, оцінки можливої ролі так званого «почуття кворуму» у поведінці *P. fluorescens* SBW25.

**2. Практичний аспект (біотехнологічний, медико-біологічний, агробіотехнологічний).** Велику увагу при виконанні роботи було приділено й **клінічним аспектам біоплівок грамнегативних бактерій**. Так, було досліджено феноменологію утворення біоплівок при пародонтиті та при інфекційних процесах. Відповідно до одержаних результатів можна стверджувати, що біоплівку цілком можна розглядати як нову фармакологічну мішень при лікуванні інфекцій, спричинених грам-негативними бактеріями. Дисертантка на підставі власних результатів, що були одержані, розглядає роль біоплівки у підтримці пулу генів резистентності в екологічній ніші, тлумачить можливу роль різноманітних біоцидів в підтримці своєрідного локального резистому, розглядає можливість створення нових матеріалів із підвищеною стійкістю до біообростання біоплівками. В цілому можна стверджувати, що розуміння патогенетичної ролі біоплівок інфекційних ізолятів відкриває фармакологічні можливості для створення нових терапевтичних протоколів, що засновані на антибіоплівковій терапії. Окрім того, цілком маємо підстави розглядати можливість створення нових агробіотехнологій праймування продуктивних рослин хімічними аналогами медіаторів бактеріального кворуму.

### **3. Розбудова нових методичних підходів.**

В контексті того, що, як було відзначено вище, одним з важливих компонентів біоплівок грамнегативних бактерій є амілоїдні фібрили, при виконанні роботи було розроблено новий високочутливий (у порівнянні з класичним методом) зелений флуоресцентний водорозчинний амінокетоенольний барвник AmyGreen. По-перше, було продемонстровано, що цей барвник майже не флуоресцює у розчині, але дає яскраве зелене випромінювання в присутності амілоїдних фібрил білків. По-друге, AmyGreen є слабо флуоресцентним в присутності біомолекул, які є компонентами клітин, екзоклітинного матриксу або середовища, зокрема в присутності нуклеїнових кислот, полісахаридів, ліпідів, білків. По-третє, цей барвник має більш високу чутливість для візуалізації амілоїдних компонентів в

біоплівкі у порівнянні з Thioflavine T (зазвичай використовують концентрації ~ 10 мкМ та ~ 100 мкМ відповідно).

І тут я хотів би ще раз звернути увагу на наступне. Хоча ця робота цілком слушно захищається за спеціальністю – **03.00.20 - біотехнологія (біологічні науки)**, втім, вона, по-суті, є **міждисциплінарною**. Неважко побачити, що, як у фундаментальному, так і у методичному та методологічному аспектах, дисертацію виконано «на перехресті» різних наук: **«БІОТЕХНОЛОГІЯ» + «МІКРОБІОЛОГІЯ» + «БІОФІЗИЧНА ХІМІЯ» + «БІОМЕДИЦИНА»**. І я відверто вітаю таку «суперпозицію», бо вона цілком віддзеркалює сучасну тенденцію розвитку **НАУК ПРО ЖИТТЯ в ХХІ сторіччі**.

В цілому ж хочу відзначити, що дослідження О.В.Мошинець виконані на високому науково-методичному рівні, а експериментальні та теоретичні методи (мікробіологічні, молекулярно-біологічні, фізико-хімічні та фізичні), що були нею застосовані, цілком є адекватними науковій меті та науковим завданням. Дійсно, дисертантці вдалося, на рівні виконання циклу комплексних біотехнологічних, молекулярно-біологічних та біофізикохімічних досліджень, одержати нову інформацію щодо структурно-функціональних особливостей окремих грамнегативних бактерій, ґрунтовно дослідити можливості використання деяких властивостей цих бактерій в біотехнологіях і клінічно-лікувальній практиці. Стверджую, що одержані дані кваліфіковано проаналізовані, переважно - по ходу викладання експериментального матеріалу. І ще раз хочу підкреслити: наукові положення та висновки, що були сформульовані на підставі аналізу дисертанткою одержаного нею фактичного матеріалу, базуються на достатній кількості експериментів, вони є цілком обґрунтованими та достовірними, та, безперечно, відображують основний зміст дисертаційної роботи.

**Практична цінність дисертації.** Очевидно, що дисертантом були одержані оригінальні експериментальні результати у галузі мікробіології та молекулярної біології, які мають й практичну спрямованість. По-суті, дисертантка довела, що біоплівку ми цілком можемо розглядати, як нову фармакологічну мішень при лікуванні інфекцій, спричинених грам-негативними бактеріями. А тлумачення патогенетичної ролі біоплівок інфекційних ізолятів відкриває фармакологічні можливості для створення нових терапевтичних протоколів, що засновані на антибіоплівковій терапії, а також нових агробіотехнологій. Безперечно, одержані нею результати є перспективними для розгляду можливості створення нових матеріалів із підвищеною стійкістю до біообрастання поверхонь (каміння, кераміка, металеві конструкції, пластики) біоплівками.

У той же час, я б хотів сформулювати деякі **запитання до дисертантки, зробити зауваження**, які виникли в мене в процесі знайомства з дисертаційною роботою:

1. Що відомо за кількісні закономірності формування біоплівок? Наприклад, за характеристичний час та швидкість її формування? Від чого ці характеристики залежать?

2. Чи може дисертантка навести якусь інформацію за фізичні та фізико-хімічні властивості матриці? Маю на увазі, наприклад, її вязкоеластичні та реологічні якості (вона є «гумоподібною?»), стійкість до тягових і механічних розривів та т.і. Чи відомо значення модуля Юнга для біоплівки? Який заряд переважно має полімерна матриця? Чи є в ній катіони металів?

3.Що відомо за силові взаємодії, які забезпечують адсорбцію «перших колоністів» на поверхні клітини?

4.І все ж таки - яким чином забезпечується «опір» (резистентність) мікроорганізмів, що входять до складу біоплівки, до дії детергентів, антибіотиків? Чи можна цей ефект оцінити кількісно? Якщо «так!», то у скільки разів зазвичай збільшується цей «опір»?

5.Чи можемо ми стверджувати, що біоплівки – то є справжні мікроекосистеми? Це питання, я думаю, має загальнобіологічне значення.

6. Мені здається, деякі розділи в тексті дисертаційної роботи є занадто багатослівні. Так, наприклад, розділ *Анотація* явно не страждає лаконічністю – його викладено майже на 10 стор. Безперечно, *Анотація* повинна бути значно більш короткою.

Втім, я повинен однозначно сказати, що вищенаведені запитання не стосуються основних результатів дисертаційної роботи, вони «не б'ють в наукове коріння» дослідження і переважно мають рекомендаційний та профілактичний характер, бо спрямовані на подальші вельми цікаві авторські наукові дослідження. Ці запитання не впливають на мою загальну високу позитивну оцінку одержаних наукових результатів та відповідних висновків, що наведені в дисертаційній роботі.

Відзначаю, що дисертація та її автореферат написані зрозумілою науковою мовою, їхні тексти добре оформлені.

На останок хочу підкреслити наступне. Я думаю, що було б дуже добре, якщо б дисертантка підготував на основі своєї роботи монографію, присвячену біотехнологічним, структурно-функціональним та фізико-хімічним особливостям і клінічно-лікувальним аспектам біоплівок грамнегативних бактерій, у якій би систематизувала, узагальнила та проаналізувала власні та літературні дані із сучасного стану відповідної проблеми. Мені здається, це була б цікава, не побоюся цього слова – унікальна, монографія для біотехнологів, мікробіологів, молекулярних біологів, фармакологів, для фахівців, які працюють у галузі біомедицини.

**Висновок.** Вважаю, що дисертація **Олени Володимирівни Мошинець «Біотехнологічні і структурно-функціональні особливості і клінічні аспекти біоплівок грамнегативних бактерій»** є завершеною комплексною науково-дослідною роботою у галузі біотехнології та мікробіології, адже завдяки цій роботі було одержано принципово нові знання щодо властивостей біоплівок деяких грамнегативних бактерій, зокрема умовно-патогенних і патогенних штамів, окреслені перспективи використання окремих властивостей цих бактерій в біотехнологіях і клінічно-лікувальній практиці. Не має сумнівів: ця робота є актуальною як в фундаментальному (науково-теоретичному), так і в практичному аспекті. Дисертація є авторитетною в методичному відношенні, адже роботу було виконано з використанням сучасних методів мікробіології, молекулярної біології, а також біофізикохімічних методів (зокрема, MALDI-TOF мас-спектрометрія, скануюча і трансмісійна електронна мікроскопія тощо). Дисертація, хоча й захищається у галузі біотехнології, має ознаки міждисциплінарного дослідження, бо її виконано «на стику» «**БІОТЕХНОЛОГІЯ**» + «**МІКРОБІОЛОГІЯ**» + «**БІОФІЗИЧНА ХІМІЯ**» + «**БІОМЕДИЦИНА**». Наукові положення та висновки, що були сформульовані на підставі аналізу одержаного фактичного матеріалу, є цілком обґрунтованими та достовірними, та, безперечно, відображують основний зміст дисертаційної роботи. Безсумнівно, результати, що були одержані при

виконанні роботи, зацікавлять як біотехнологів, так і фахівців у галузі мікробіології та молекулярної біології, а також біохіміків і фармакологів та спеціалістів з медичної біології.

За актуальністю та обсягом, новизною та науково-практичною значимістю ця робота відповідає усім вимогам, що висуваються до докторських дисертацій - п.п. 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення ступеня доктора наук», затвердженого Постановою КМУ № 1197 від 17.11.2021р., а її авторка – МОШИНЕЦЬ Олена Володимирівна, цілком заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія (біологічні науки).

Офіційний опонент:

академік НАН України,

доктор біологічних наук, професор,

заступник директора з наукової роботи, завідувач відділу біохімії м'язів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

Заслужений діяч науки і техніки України,

Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки,

Лауреат Премії ім. академіка О.В.Палладіна НАН України,

Лауреат Премії ім. академіка П.Г.Костюка НАН України,

Лауреат Премії ім. Тараса Шевченка

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Сергій Костерін

2 вересня 2025 р.

Підпис *Сергія Костеріна*  
ЗАСВІДЧУЮ  
Зав. канцелярією  
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна  
національної академії наук України  
"02" 09 2025р.

