

## Відгук

**Офіційного опонента на дисертаційну роботу Мошинець Олени Володимирівни на тему: «Біотехнологічні і структурно-функціональні особливості і клінічні аспекти біоплівки грамнегативних бактерій», представлену на здобуття ступеня доктора біологічних наук (за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія (біологічні науки)).**

**Актуальність роботи.** Проблема біоплівок є однією з ключових у сучасній мікробіології, медицині, біотехнології та екології. Відомо, що переважна більшість бактерій у природних і техногенних умовах існують не у вигляді вільноплаваючих клітин, а в складі біоплівок — організованих мікробних консорціумів, захищених матриксом з полісахаридів, білків, амілоїдів і екзоклітинної ДНК. Така форма існування забезпечує мікроорганізмам стійкість до впливу зовнішніх факторів, включаючи антибіотики, антисептики, зміни температури та рН. Саме біоплівки лежать в основі хронічних інфекцій, нозокоміальних уражень і значною мірою визначають формування та поширення антибіотикорезистентності. Тому вивчення структурних і функціональних аспектів біоплівок має не лише фундаментальне, але й величезне прикладне значення.

Особливої актуальності дослідження набувають у сучасних умовах, коли проблема мультирезистентних інфекцій набула глобального характеру. ВООЗ відносить резистентність грамнегативних бактерій до одного з найбільших викликів для системи охорони здоров'я у XXI столітті. У лікарнях саме біоплівки на поверхні катетерів, ендотрахеальних трубок, протезів та інших імплантів є джерелом хронічних госпітальних інфекцій, що погано піддаються лікуванню. Для України ця проблема особливо гостра у зв'язку з воєнними діями, які призвели до різкого збільшення кількості тяжких поранень, ускладнених інфекціями, викликаними мультирезистентними штамми *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та іншими патогенами. У цих випадках біоплівковий спосіб існування бактерій суттєво знижує ефективність терапії, збільшує смертність і подовжує терміни лікування. Отже, пошук нових підходів до вивчення й руйнування біоплівок є не лише актуальним, а й критично важливим завданням для медицини України та світу.

Важливим аспектом є й те, що біоплівки відіграють ключову роль у збереженні та горизонтальному поширенні генів антибіотикорезистентності. Саме в структурі біоплівок відбувається активний обмін мобільними генетичними елементами, що створює резервуар для появи нових резистентних варіантів патогенів. Це робить дослідження біоплівок важливим елементом у розробці глобальних стратегій протидії антимікробній

резистентності. У дисертації обґрунтовано, що розуміння структурних компонентів біоплівки (целюлоза, амілоїди, екзоклітинна ДНК) відкриває шлях до створення таргетованих антибіоплівкових препаратів і матеріалів, здатних руйнувати матрикс або перешкоджати його формуванню. Це має принципове значення для профілактики і лікування інфекцій, асоційованих із біоплівками.

Не менш актуальним є агробіотехнологічний аспект теми. Біоплівки мікроорганізмів у ризосфері рослин визначають ефективність взаємодії бактерій із корневими системами та впливають на продуктивність культур. Дисертанткою показано, що сигнальні молекули почуття кворуму можуть позитивно впливати на врожайність пшениці, що відкриває перспективи створення нових екологічних біопрепаратів для сільського господарства. Таким чином, результати дослідження мають значення не лише для медицини та інфектології, але й для розвитку аграрного сектору, що особливо важливо для України як аграрної держави.

Таким чином, актуальність вивчення біоплівок у рамках цієї дисертації визначається сукупністю факторів: глобальною проблемою мультирезистентних інфекцій, зростанням ролі госпітальних біоплівок у клінічній практиці, необхідністю пошуку нових антибіоплівкових терапій і матеріалів, потребою у зниженні поширення генів резистентності, а також перспективами використання знань про біоплівки у біотехнології та сільському господарстві. Вибір теми є обґрунтованим і відповідає найважливішим науковим і практичним викликам сучасності.

Тож тема дисертаційної роботи О.В. Мошинець є надзвичайно актуальною. Додаткової ваги обрана проблематика набуває в умовах воєнних дій в Україні, де кількість інфекцій, ускладнених полірезистентними госпітальними штамами, суттєво зростає. Дисертантка не лише комплексно досліджує фундаментальні механізми формування біоплівок, а й безпосередньо пов'язує результати з вирішенням актуальних завдань клінічної практики, а також з біотехнологічними й аграрними застосуваннями.

**Наукова новизна роботи.** У дисертаційній роботі отримано ряд результатів, що мають безперечну наукову новизну. Зокрема, експериментально підтверджено ключову роль целюлози в структурі біоплівок *Bordetella avium* 197N, виявлено молекулярні механізми регуляції її синтезу через c-di-GMP; вперше показано функціональне значення бактеріальних амілоїдів у формуванні біоплівки та розроблено новий високочутливий барвник AmyGreen для їх візуалізації; з'ясовано роль екзоклітинної ДНК (як бактеріальної, так і імунної клітин господаря) у підтриманні пародонтних біоплівок, що поглиблює розуміння патогенезу пародонтиту; доведено синергетичний ефект азитроміцину з колістином та меропенемом у лікуванні біоплівкових інфекцій *Klebsiella pneumoniae*,

включно з клінічними кейсами лікування поранених пацієнтів; показано різноспрямовану дію нових хімічних сполук на різні бактеріальні види, що демонструє необхідність комплексної оцінки нових антибіоплівкових агентів; запропоновано нові матеріали і поверхневі покриття з антибіоплівковими властивостями (полімерні біоциди, лазерна модифікація металів); вперше обґрунтовано можливість використання молекул почуття кворуму (ацилгомосеринлактонів) для стимуляції росту та підвищення врожайності пшениці.

Ці результати суттєво розширюють уявлення про молекулярні механізми біоплівкоутворення та відкривають нові прикладні напрями.

**Практичне значення результатів дослідження.** Отримані результати мають велике практичне значення для медицини та клінічної мікробіології. Уперше для клінічних ізолятів мультирезистентних грамнегативних бактерій, зокрема *Klebsiella pneumoniae*, було обґрунтовано й експериментально підтверджено ефективність комбінованого застосування азитроміцину з колістином та меропенемом, що продемонструвало здатність руйнувати біоплівкові структури та підвищувати чутливість патогенів до лікування. Важливо, що ці результати були апробовані у реальних клінічних умовах при лікуванні тяжкопоранених пацієнтів, що свідчить про їхню високу прикладну значущість і можливість практичного використання в інфектології. Крім того, у роботі показано вплив сучасних біоцидів та полімерних матеріалів на зрілі біоплівки, що створює наукове підґрунтя для розробки нових дезінфекційних засобів та інфекційного контролю у медичних закладах.

Практичне значення роботи проявляється і у створенні нових інструментів для лабораторної та наукової діяльності. Зокрема, розроблений дисертанткою флуоресцентний барвник **AmyGreen** дозволяє більш точно та чутливо виявляти амілоїдні білки у складі біоплівок, що розширює можливості вивчення структурно-функціональних компонентів мікробних спільнот. Використання цього барвника може бути рекомендоване науково-дослідним лабораторіям, які займаються питаннями мікробної фізіології, антибіоплівкових стратегій та розробкою нових протимікробних препаратів. Окрім того, отримані результати щодо ролі екзоклітинної ДНК у підтриманні мультикультурних біоплівок відкривають нові можливості для таргетованої терапії пародонтологічних інфекцій.

Важливе прикладне значення мають і агробіотехнологічні результати дослідження. Дисертанткою вперше показано можливість використання молекул почуття кворуму (ацилгомосеринлактонів) для праймування насіння пшениці, що сприяє підвищенню врожайності та стійкості рослин. Це відкриває перспективи створення нових екологічно безпечних біопрепаратів, здатних замінити або доповнити хімічні добрива й стимулятори росту, що є особливо актуальним у контексті сучасних викликів аграрного виробництва.

Таким чином, результати дисертаційної роботи мають багатовекторне практичне значення і можуть бути використані у медицині, інфекційному контролі, лабораторній практиці та сільському господарстві.

**Структура дисертації.** Дисертаційна робота має логічну та традиційну для докторських досліджень структуру, що складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи», основних експериментальних розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Така побудова забезпечує цілісність і послідовність викладу, сприяє чіткому розкриттю наукової проблематики та обґрунтуванню зроблених висновків. Дисертація викладена на 459 сторінках, містить 142 рисунки та 21 таблицю

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання дослідження, визначено об'єкт, предмет і методи роботи, а також показано наукову новизну та практичне значення одержаних результатів. Текст вступу є чітким і аргументованим, він переконливо демонструє, що дисертація спрямована на вирішення важливої наукової та прикладної проблеми.

**Огляд літератури** базується на опублікованих главах монографій і є ґрунтовним і відображає сучасний стан вивчення біоплівки у світовій та вітчизняній науці. Особливістю є надзвичайно великий обсяг використаних джерел (понад 1400 позицій), що підтверджує високий рівень обізнаності дисертантки. Разом із тим, в огляді простежується певна перевантаженість фактичним матеріалом і повтори, що ускладнюють виділення головних наукових проблем, які стали основою для постановки власних досліджень.

**Матеріали і методи.** У цьому розділі детально подано характеристику використаних бактеріальних штамів, умов культивування, методик формування і візуалізації біоплівки, описано молекулярно-біологічні та біохімічні методи. Позитивно оцінюється застосування широкого спектра методів (мікробіологічних, флуоресцентної та електронної мікроскопії, генетичних, хімічних), що забезпечує комплексність і надійність отриманих результатів. Виклад методик достатньо повний, що дозволяє відтворити досліди.

**Основні експериментальні розділи. Глава 1.** У цій главі досліджено роль целюлози як ключового каркасного компонента біоплівки. Використовуючи генетичні та мікроскопічні методи, дисертантка довела, що синтез целюлози регулюється вторинним месенджером c-di-GMP і безпосередньо визначає архітектуру біоплівки. Цей результат є важливим внеском у розуміння фундаментальних механізмів біоплівкоутворення. До сильних сторін глави належить застосування різних підходів (мутаційний аналіз, візуалізація матриксу, порівняння з дикого типу та мутантними штамми). Водночас, можна було б подати ширший порівняльний аналіз із подібними системами в інших представників *Proteobacteria*.

**Глава 2.** Дисертантка вперше продемонструвала, що у складі біоплівок певних грамнегативних бактерій присутні функціональні амілоїдні структури, які стабілізують матрикс і підвищують його стійкість до зовнішніх факторів. З цією метою створено новий флуоресцентний барвник **AmyGreen**, що має більшу чутливість і специфічність у порівнянні з традиційними барвниками (Thioflavin T). Глава містить комплексний аналіз — від хімічного синтезу барвника до його апробації на різних бактеріальних моделях. Це один із найбільш інноваційних блоків дисертації, що поєднує фундаментальний та прикладний аспекти.

**Глава 3.** Дослідження показало, що екзоклітинна ДНК у складі біоплівки походить не лише від бактерій, а й від імунних клітин хазяїна. Доведено, що саме ця ДНК забезпечує довготривале існування патологічних біоплівкових структур у порожнині рота при пародонтиті. Цей результат відкриває новий погляд на патогенез запальних захворювань і пропонує перспективні мішені для терапії (ферменти, що деградують ДНК). Глава відзначається міждисциплінарним підходом, проте їй бракує більш детального аналізу клінічних вибірок і статистичної верифікації.

**Глава 4.** Цей розділ має безпосереднє клінічне значення. Дисертантка показала, що мультирезистентні ізоляти *K. pneumoniae*, отримані в Україні, формують щільні й стійкі біоплівки, які різко знижують ефективність традиційних антибіотиків. Було доведено, що поєднання азитроміцину з колістином і меропенемом руйнує матрикс біоплівки та підвищує чутливість бактерій. Важливо, що ці результати підтверджено у клінічній практиці при лікуванні тяжкопоранених пацієнтів. Це один із найсильніших прикладних блоків роботи, хоча кількісна оцінка ефективності лікування потребує більш широких статистичних даних.

**Глава 5.** У цій главі досліджено вплив різних груп дезінфектантів і полімерних біоцидів на зрілі біоплівки грамнегативних бактерій. Особливу увагу приділено екзоклітинній ДНК як основній мішені для дії біоцидів. Показано, що ефективність різних речовин суттєво відрізняється залежно від виду бактерій, що має важливе значення для практики інфекційного контролю в лікарнях. Окремо розглянуто нові матеріали й поверхні з антибіоплівковими властивостями, у тому числі створені методом лазерної модифікації металів. Цей блок є перспективним, але вимагає подальшого вивчення токсикологічних та екологічних наслідків запропонованих сполук.

**Глава 6.** У заключному експериментальному розділі досліджено вплив молекул кворум-сенсингу (ацилгомосеринлактонів) на ріст і розвиток пшениці. Доведено, що праймування насіння цими сигнальними молекулами сприяє підвищенню врожайності та стійкості рослин. Це новий напрям, що поєднує мікробіологію з агробіотехнологією,

відкриває можливості створення біопрепаратів нового покоління. Глава цікава з точки зору інноваційності, хоча потребує подальших широкомасштабних польових випробувань.

**Висновки** є повними та відображають основні здобутки дисертації. Вони логічно випливають із проведених досліджень, хоча могли б бути подані у більш лаконічній і структурованій формі — із чіткішим розмежуванням фундаментальних і прикладних результатів.

**Список використаних джерел** надзвичайно об'ємний (понад 1400 найменувань) і включає сучасні публікації з міжнародних джерел, що свідчить про глибоке занурення дисертантки у проблематику. Перелік цих джерел є частково оптимізований для систематизації опублікованих робіт для яких окремо наводиться 172 джерела посилання.

**Додатки.** Додаткові матеріали ілюструють експериментальні дані, містять таблиці та графіки, що робить роботу більш прозорою і зрозумілою.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та в авторефераті.** Основні положення дисертаційної роботи О.В. Мошинець знайшли відображення у достатній кількості наукових публікацій у фахових виданнях, у тому числі міжнародних журналах, що індексуються в базах *Scopus* та *Web of Science*. Серед них є статті у виданнях з високим імпаکت-фактором, у тому числі у журналах Q1 категорії, що свідчить про міжнародне визнання та високу якість отриманих результатів. У працях послідовно висвітлено ключові результати дисертації: роль целюлози та амілоїдів у біоплівках, створення нового барвника AmyGreen, вивчення екзоклітинної ДНК у патогенних біоплівках, розробку комбінованих антибіотикотерапевтичних схем для мультирезистентних ізолятів *Klebsiella pneumoniae*, дослідження впливу біоцидів та агробіотехнологічне застосування молекул кворум-сенсингу. Така широта публікаційного відображення підтверджує повноту представлення основних здобутків дисертації.

Автореферат дисертації адекватно відображає її зміст, структурованість та основні наукові положення. У ньому наведено обґрунтування актуальності теми, сформульовано мету та завдання дослідження, окреслено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, а також стисло викладено головні висновки. Разом із тим, враховуючи міждисциплінарний характер роботи та велику кількість експериментальних блоків, деякі результати подані у більш узагальненому вигляді, ніж у повному тексті дисертації. Це цілком відповідає вимогам до авторефератів, проте для комплексного уявлення про масштаб дослідження доцільно звернутися безпосередньо до повного тексту.

У цілому, можна стверджувати, що як публікації здобувачки, так і автореферат забезпечують повне та достатнє відображення змісту дисертаційної роботи, підтверджують

наукову новизну та практичну значущість отриманих результатів і відповідають встановленим вимогам.

**Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.** Попри високий науковий рівень, масштабність і значущість проведеного дослідження, робота має окремі незначні недоліки, які не знижують наукової цінності та практичної значущості роботи, мають рекомендаційний характер і в цілому підкреслюють перспективи подальшого розвитку наукової діяльності дисертантки.

Під час офіційного захисту від автора хотілось б почути відповіді на наступні запитання:

1. У роботі показано роль целюлози як ключового структурного компонента біоплівки. Чи можна говорити про універсальність цього механізму для всіх грамнегативних бактерій, чи він притаманний лише окремим представникам?
2. Створений Вами барвник AmyGreen продемонстрував високу специфічність до амілоїдних структур. Чи бачите Ви перспективи його застосування у клінічній діагностиці (наприклад, при біопсії тканин) або ж його використання обмежується лише експериментальною мікробіологією?
3. Ви довели важливу роль екзоклітинної ДНК клітин господаря у підтриманні патологічних біоплівок при пародонтиті. Чи розглядаєте Ви можливість використання ДНК-ази або інших ферментів як терапевтичних засобів у стоматологічній практиці?
4. У клінічних експериментах продемонстровано синергізм азитроміцину з колістином і меропенемом. Чи можна вважати ці дані достатньою підставою для розробки офіційних протоколів лікування мультирезистентних інфекцій, чи потрібні додаткові багатоцентрові клінічні дослідження?
5. У розділі про вплив біоцидів Ви зазначаєте суттєві міжвидові відмінності їхньої ефективності. Чи можна на основі цих даних розробити універсальні антисептичні засоби, чи радше слід орієнтуватися на вузькоспецифічні препарати для окремих патогенів?
6. Ви пропонуєте застосування сигнальних молекул кворум-сенсингу для підвищення врожайності пшениці. Чи досліджувались можливі ризики такого підходу, зокрема вплив на ґрунтові мікробні спільноти або поширення небажаних генетичних елементів?
7. Дисертація охоплює фундаментальні, клінічні та аграрні аспекти. Яким із цих напрямів Ви бачите подальший розвиток своїх досліджень у першу чергу?
8. У роботі показано нові можливості модифікації поверхонь для запобігання біоплівкоутворенню. Чи проводилися випробування на реальних медичних пристроях або у промислових умовах, і якщо так, які результати були отримані?

Вважаю, що дисертаційна робота Мошинець Олени Володимирівні «Біотехнологічні і структурно-функціональні особливості і клінічні аспекти біоплівки грамнегативних бактерій» оформлена відповідно до наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 №40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій», відповідає Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 №1197, а її автор Мошинець Олена Володимирівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук з наукової спеціальності 03.00.20 - біотехнологія (біологічні науки).

**Офіційний опонент**

Радник при дирекції,

Доктор біологічних наук,

професор, академік НАН України

Валентин ПІДГОРСЬКИЙ

Підпис *Валентина Підгорського*  
засвідчено  
завідувачем канцелярії *Коваль Р.В.*