

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

Актуальність теми дисертації. Дослідження бактеріальних біоплівок є надзвичайно актуальними для сучасної біотехнології, мікробіології та медицини. Це зумовлено їхнім істотним впливом як на здоров'я людини та ефективність лікування бактеріальних інфекцій, так і на різноманітні промислові та природні системи. Біоплівки здатні утворюватись на різних поверхнях, зокрема, тканинах тіла, а також металевих та пластикових поверхнях, в тому числі на поверхнях медичних пристроїв та імплантів. Бактерії у складі біоплівок об'єднані екстрацелюлярним матриксом, який складається з полісахаридів, білків і нуклеїнових кислот і, завдяки цьому, є дуже стійкими до антибіотиків та дезінфікуючих засобів. Це зумовлює проблематичність лікування таких інфекцій. Ця форма існування бактерій також забезпечує їх підвищену стійкість до імунної системи організму. Бактеріальні біоплівки відіграють важливу роль у розвитку хронічних і госпітальних інфекцій, ускладнюють лікування опіків, ран та інфекцій, пов'язаних з імплантами та катетерами, збільшують ризик рецидивів. Зважаючи на це, важливими є дослідження, спрямовані на вивчення механізмів їхньої стійкості, для створення ефективних підходів боротьби з біоплівками та зниження резистентності бактерій.

Для сучасної України ця проблема має особливе значення у зв'язку з воєнними діями, які призвели до різкого зростання числа тяжких поранень та опіків, лікування яких ускладнено мультирезистентними грамнегативними інфекціями.

Згідно результатів останніх досліджень (Khaled et al., 2021, Jan et al., 2024), інфекції, пов'язані з біоплівками, зумовлюють рівень смертності близько 60%, спричиняють значне фінансове навантаження на систему охорони здоров'я і тому вважаються однією з критичних проблем для економіки світу. Крім того, бактеріальні біоплівки сприяють корозії обладнання та поверхонь у промисловості, що призводить до значних економічних збитків.

Таким чином, дослідження біоплівок є важливими як для медицини, так і охорони довкілля і промислової безпеки, оскільки можуть забезпечити можливість розробки нових антимікробних засобів і технологій боротьби з бактеріальними утвореннями.

Мета дисертаційної роботи О.В.Мошинець полягала у дослідженні структурно-функціональних особливостей біоплівок деяких грам-негативних бактерій та розробці підходів до лікування деяких інфекційних процесів, асоційованих з утворенням бактеріальних біоплівок.

Таким чином, оскільки дана дисертаційна робота присвячена розв'язанню однієї з найважливіших проблем сучасних біотехнології та медицини, її **актуальність** не викликає сумнівів, адже є нагальна потреба у розробці нових стратегій контролю стійкості бактерій.

Відповідно до мети сформульовано цілу низку завдань, як зокрема: дослідження ролі целюлози, екзоклітинної ДНК, амілоїдних фібрил в біоплівках грам-негативних бактерій; дослідження особливостей патогенезу деяких інфекційних процесів, асоційованих з утворенням біоплівок; дослідження ролі бактеріальних біоплівок як джерела генів резистентності у госпітальному середовищі; окремі завдання присвячені створенню нових матеріалів з анти-біоплівковими та анти-ДНК властивостями. Всі ці задачі були успішно розв'язані авторкою за допомогою широкого набору засобів біотехнології, мікробіології, молекулярної біології та біоорганічної хімії.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисертантки є частиною держбюджетних та грантових досліджень відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, зокрема: науково-дослідного проєкту “Розробка біотехнології праймування пшениці на основі бактерійних сигнальних молекул класу ацилгомосеринлактонів для підвищення стійкості і врожайності” (№ держреєстрації 0115U004178) в рамках мультидисциплінарної програми НАНУ “Молекулярні та клітинні біотехнології для медицини, індустрії та аграрних наук” та науково-дослідної роботи “Вплив бактеріальних сигнальних молекул на врожайність та рослинні мікробні асоціації” у співпраці з Julius Kühn-Institut Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Німеччина (№ держреєстрації 0119U103436), проєкту «Розробка комплексного препарату комбінованої дії на основі похідних колагену для лікування раневих поверхонь» (№ держреєстрації 0120U101290), науково-технічної роботи 2020.02/0246 «Розробка комбінованої терапії важких *Klebsiella pneumoniae*–асоційованих нозокоміальних інфекцій для подолання їхньої антибіотикорезистентності», що виконувалась за підтримки Національного фонду досліджень України за програмою “Підтримка досліджень провідних та молодих учених” (№ держреєстрації 0120U104850), індивідуального гранту на дослідження за проєктом “Etiology of extracellular DNA in pathogenic biofilms associated with periodontitis” що профінансовано програмою УНТЦ для стипендіальної програми віртуального залучення українських науковців (STCU program for Virtual Scientist Engagement Fellowship Program for Ukrainian Scientists, Grant Agreement #2008-VSE) та проєкту за програмою NATO Science for Peace and Security multi-year project SPS G6053 “Inhibition of Bacterial Settlement and Biofilm Formation through Physical Control of the Environment (PHYBI)” (№ держреєстрації 0124U002389).

Фінансова підтримка таких робіт не тільки Національною академією наук України, Національним фондом досліджень України, а і рядом міжнародних

проектів за програмами УНТЦ та НАТО свідчить про актуальність проведення таких досліджень.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота є науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей і викладена на 459 друкованих сторінках. Розділами дисертації фактично є публікації здобувача у провідних міжнародних та вітчизняних виданнях. Це стосується і розділу, присвяченого аналізу наукової літератури, в якому наведені оглядові статті здобувача.

З 21-ї опублікованої за результатами роботи наукової статті - 15 статей опубліковано у виданнях, що належать до 1-2 квантилів відповідно до класифікації SCImago та мають високі імпаکت-фактори.

Дисертація складається зі 1) вступу; 2) огляду літератури, присвяченого аналізу бактеріальних біоплівки як універсальної природної агрегації мікробних клітин; 3) розділу матеріалів і методів досліджень, в якому детально описані застосовані у дослідженні методи отримання та дослідження складу бактеріальних біоплівки, методи дослідження антибіоплівкових властивостей поверхонь, методи електронної мікроскопії, мас-спектрометрії, флуоресцентної гібридизації *in situ*, ПЛР, методи синтезу полімерних та катіонних біоцидів, методи біоінформатичного аналізу та комп'ютерного моделювання, методи дослідження схожості насіння пшениці та дослідження посівів, методи дослідження асоційованих з ризосферою бактерій, а також описано застосовані у дослідженні статистичні методи; 4) експериментальної частини, яка складається з чотирьох розділів, присвячених структурним особливостям біоплівки грамнегативних бактерій (розділ 3), дослідженню ролі біоплівки у розвитку інфекційних ускладнень (розділ 4), дослідженню ролі біоплівки як джерела генів резистому у госпітальному середовищі (розділ 5) та розробці ботехнологій на основі біоплівки грамнегативних бактерій для підвищення продуктивності пшениці (розділ 6); 5) висновків; 6) переліку використаних джерел та 7) додатку, в якому дублюється список публікацій здобувача вже наведений на стор. 20-31 дисертації. Висновки є

обґрунтованими та в повній мірі відображають основні результати дисертаційної роботи, відповідають всім поставленим в дисертаційній роботі завданням, хоча доцільно було б їх зробити більш структурованими та лаконічними. Всі висновки опубліковано у відповідних наукових працях.

Щодо списку використаної літератури, 172 англomовні джерела наведені у «Списку літературних джерел» в дисертаційній роботі. Крім того, 1250 джерел цитуються в роботах здобувача. Робота містить 142 рисунка і 21 таблицю, опублікованих в наукових працях здобувача.

Привертає увагу певна нерівномірність розподілу матеріалу між розділами: матеріал експериментальних досліджень у деяких розділах представлений надзвичайно детально, тоді як у інших – міг би бути представлений повніше. Це стосується насамперед досліджень, пов'язаних з дослідженням можливостей збільшення продуктивності рослин, що мають сільськогосподарське значення.

Наукове значення та новизна дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Мошинець О.В. містить низку як нових фундаментальних наукових результатів, так і розроблених автором нових методологічних підходів. Наукова новизна роботи О.В. Мошинець полягає у всебічному вивченні структурних компонентів та складу біоплівок, а також розробці нових ефективних методів їх аналізу і візуалізації. Відзначу, на мій погляд, найбільш вагомі результати: визначення ролі целюлози у біоплівках деяких грамнегативних бактерій, зокрема, *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (екотип Wrinkly Spreader) та *Bordetella avium*-197N, включно з виявленням механізмів її синтезу та регуляції; створення нового флуоресцентного барвника AmyGreen для візуалізації амілоїдних структур у біоплівках, який є більш ефективним та специфічним за традиційний тіофлавін Т; розкриття ролі екзоклітинної ДНК хазяїна як ключового чинника персистенції патогенних біоплівок при пародонтиті; підтвердження синергетичного ефекту поєднання азитроміцину з колістином і меропенемом при лікуванні мультирезистентних інфекцій, включаючи унікальні клінічні випадки лікування поранених

військових; виявлення різноспрямованих ефектів нових хімічних сполук на грампозитивні та грамнегативні бактерії, що визначає необхідність їхнього ретельного тестування на бактеріальних біоплівках; визначення впливу різних груп біоцидів на екзоклітинну ДНК у зрілих біоплівках, що має важливе значення для ефективної дезінфекції у лікарнях; експериментальне підтвердження можливості використання сигнальних молекул почуття кворуму для стимуляції росту та підвищення врожайності пшениці.

Практичне значення результатів дисертації. Робота має велике практичне значення як для біотехнології, так і клінічної медицини та діагностики, а також промисловості. Зокрема, для клінічної медицини обґрунтовано та апробовано нові терапевтичні комбінації антибіотиків, які можуть бути використані для лікування інфекцій, що викликаються мультирезистентними грамнегативними бактеріями. Для лабораторної діагностики запропоновано новий барвник AmyGreen, який є ефективним інструментом дослідження біоплівок та підвищує точність аналізу їхньої структури. Запропоновано нові полімерні біоциди та методи модифікації поверхонь (у тому числі з використанням лазера), які запобігають утворенню біоплівок на поверхнях медичних і технічних матеріалів. Підтверджено ефективність обробки насіння пшениці сигнальними молекулами почуття кворуму, що має значення для підвищення продуктивності зернових культур і може бути використано в сільському господарстві.

Таким чином, результати дисертації мають значення як для фундаментальної науки, так і для практичної медицини, сільського господарства та промисловості. У роботі вдало поєднуються фундаментальні мікробіологічні та молекулярно-біологічні дослідження з клінічно-орієнтованими експериментами і, навіть, з агробіотехнологічними напрямками, що підкреслює міждисциплінарний характер дослідження.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень. Високий ступінь надійності одержаних результатів і обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації, забезпечується використанням

автором сучасних експериментальних методів, адекватних поставленим задачам. Положення, сформульовані в роботі, проілюстровані великою кількістю рисунків і таблиць, результати отримано з використанням сучасних методів досліджень - від мікроскопії та молекулярно-генетичних підходів до хімічного синтезу, опрацьовано статистично. Виклад матеріалу відповідає меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачкою, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації не викликає сумніву.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Матеріали дисертації повно відображено у публікаціях та авторефераті дисертації. За темою дисертації опубліковано 21 статтю, з яких 1 стаття у науковому фаховому виданні України та 20 – у міжнародних наукових виданнях, що індексуються в наукометричних базах даних Scopus та Web of Science, з них - 15 експериментальних статей опубліковано у рейтингових наукових виданнях, що належать до 1-2 кuartилів згідно бази даних SCImago. Крім того, опубліковано 30 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Оцінка мови та стилю дисертації. Характеризуючи дисертацію в цілому, хочу сказати, що вона побудована логічно, написана доступно науковою мовою, достатньо ілюстрована числовим і графічним матеріалом (142 рисунки та 21 таблиця), викладена на 459 сторінках машинопису. Автореферат у стислій формі повністю віддзеркалює зміст самої дисертації, її основні висновки і положення. В цьому сенсі опонент не зафіксував жодних розбіжностей.

Відповідність змісту дисертації спеціальності, за якою вона подається до захисту. Опонована дисертаційна робота по суті є мультидисциплінарною, яка об'єднує низку сучасних напрямків науки: біотехнологію, мікробіологію, молекулярне моделювання, біохімічні та молекулярно-біологічні дослідження, фізико-хімічні методи дослідження бактеріальних біоплівки, проте аналіз **паспорту спеціальності 03.00.20** – біотехнологія свідчить про те,

що дисертація Мошинець О.В. повністю відповідає спеціальності, за якою подається до захисту.

Оцінка змісту дисертації, її завершеність та дотримання принципів академічної доброчесності. Дисертаційна робота Мошинець О.В. є завершеною науковою працею і свідчить про наявність значного особистого внеску здобувача у сучасну біотехнологію та повністю відповідає вимогам, що висуваються до робіт, представлених на здобуття ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Розглянувши звіт подібності за результатами перевірки дисертаційної роботи на текстові збіги, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Мошинець Олени Володимирівни є результатом самостійних досліджень здобувача, не містить елементів фальсифікації, фабрикації, плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають належні посилання на відповідне джерело.

Зауваження, побажання, дискусійні питання. Зауважень принципового характеру до роботи немає. Проте, як це властиво більшості наукових досліджень, робота не позбавлена певних недоліків, а деякі положення потребують уточнень:

1. Вступ варто було зробити більш структурованим та акцентувати увагу читачів на проблемах, які на момент початку роботи не були розв'язані і розв'язанню яких була присвячена дисертаційна робота, а не лише декларувати, що робота «додає нові дані про роль целюлози, екзоклітинної ДНК, амілоїдних фібрил і т.д.».

2. Анотація, наведена в дисертаційній роботі, багато в чому дослівно повторює вступ та відрізняється від анотації роботи, яка наведена в авторефераті. Варто було утриматись від дослівного дублювання тексту в одній і тій же науковій праці, а в дисертації надати анотацію, наведену у авторефераті.

3. Робота присвячена розв'язанню цілого ряду дуже різних проблем від дослідження складу біоплівки деяких грам-негативних бактерій та спроб з'ясування природи антибіотикорезистентності у госпітальному середовищі, до застосування біотехнологій на основі біоплівки грам-негативних бактерій у сільському господарстві і, через це, справляє враження дещо фрагментарної. На мою думку варто було приділити більше уваги формулюванню логічних зв'язок між розділами, щоб робота сприймалась як цілісна наукова праця.

4. Для дослідження бактеріальних амілоїдів розроблено новий барвник AmyGreen, який за твердженням авторки є «більш чутливим» за традиційно застосовуваний тіофлавін Т. Як доказ цього твердження авторка наводить фотографії, отримані за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії. Виникає питання: чи оцінювали ефективність синтезованого барвника лише візуально, чи визначали його ефективність також кількісно, наприклад, використовуючи програми аналізу цифрових зображень, і якщо так - чи проводили статистичну обробку результатів дослідження. Який параметр використовували як міру «чутливості» барвників?

5. У розділі, присвяченому анти-біоплівковій терапії клебсієльозів (автореферат, стор. 21-27), дуже детально описана історія 32-річного військовослужбовця з проникаючим пораненням живота, множинною полірезистентною інфекцією, а також історія його лікування. Чи проводили подібні дослідження на інших пацієнтах з полірезистентними інфекціями та чи є статистичні дані, які би підтверджували ефективність застосування обраного підходу у медичній практиці?

6. У роботі запропоновано застосування нових біоцидів, проте хотілось би побачити більш детальні результати дослідження їх потенційної токсичності, що є важливим для широкого практичного застосування.

7. Автореферат с. 49. Авторка стверджує, що при дослідженнях сортів пшениці Ятрань та Володарка оцінювали «...довжину качана, кількість колосків на качан, кількість зерен на качан...», тоді як широко відомо, що суцвіття пшениці називається не качаном, а складним колосом, який

складається з центрального стрижня і розташованих на ньому окремих колосків.

8. На мою думку, авторці слід було більше звернути увагу на обговорення отриманих результатів. В дисертації відсутній розділ «Обговорення результатів дослідження» і фактично немає обговорення цікавих з наукової точки зору питань та порівняння отриманих авторкою результатів з даними, отриманими іншими авторами, хоча це могло би підкреслити актуальність та новизну роботи та представити її більш вигідно.

9. У головному узагальнюючому висновку дисертаційної роботи автор перераховує те, що саме досліджувалось в роботі («досліджено феноменологію утворення біоплівки», «розглядається можливість створення нових агробіотехнологій», «розглядається можлива роль біоцидів»), тоді як бажано би було коротко сформулювати, що саме було виявлено, встановлено авторкою та коротко сформулювати концепцію роботи.

10. Загалом як автореферат, так і дисертаційна робота містить дуже велику кількість друкарських помилок, пропущених слів, часто відмінки та однина/множина в одному й тому ж реченні/словосполученні не відповідають один одному; зустрічається багато слів, які є невдалим перекладом з англійської мови (зокрема, «матеріали з анти-ДНК-діями», а не властивостями; «біоплівко-стимулюючі активності молекул» замість властивостей). Багато використаних термінів містять помилки («трансмисивна електронна мікроскопія» замість трансмісійної електронної мікроскопії; використовується термін «генеторегенність амілоїдогенезу»; використано термін «полісетринові плашки» замість полістиролових планшетів; «качан пшениці» замість колосу пшениці; фарба ПФ-115 в роботі має, очевидно, англійську аббревіатуру PP-115; «амілоїдний генез» замість амілоїдогенезу) і т.д.

Зазначені недоліки не мають принципового характеру, не зменшують наукової цінності роботи, яка є міждисциплінарним дослідженням високого рівня, та не впливають на її загальну високу позитивну оцінку.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Мошинець Олени Володимирівни «Біотехнологічні і структурно-функціональні особливості і клінічні аспекти біоплівки грамнегативних бактерій», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія є актуальною завершеною науковою працею, яка за науковою новизною, важливістю і значенням отриманих результатів для теорії та практики, рівнем проведених досліджень, рівнем висвітлення їх у фахових виданнях та матеріалах наукових конференцій відповідає вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 року №1197, а її авторка Мошинець Олена Володимирівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,
 доктор біологічних наук, с.н.с.,
 член-кореспондент НАН України,
 провідний науковий співробітник
 Інституту молекулярної біології
 і генетики НАН України



Тетяна СЕРГЕСВА

19 вересня 2025 р.



Тетяна Сергєва
 Олена Мошинець