

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора ветеринарних наук, старшого наукового співробітника Кушніра Ігора Михайловича на дисертацію Горюк Юлії Вікторівни «**Обґрунтування, розробка та застосування бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит**», представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду Д 35.826.03 при Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького подану на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія

1. Актуальність теми дисертації. Дисертаційна робота Горюк Юлії Вікторівни, представлена до офіційного захисту, присвячена вирішенню актуального питання, що дозволить внести значний вклад у вирішення такої важливої проблеми як підвищення ефективності терапії маститу та зменшення розповсюдження у навколишньому середовищі антибіотикостійких збудників маститу. Адже, мастит корів – це рекурентне захворювання, яке досить часто рецидивує і молочне скотарство зазнає значних збитків через недоотримання молока і його вибракування під час застосування антибіотиків. Крім того, переважаючий збудник маститу корів – золотистий стафілокок протягом останніх років швидко набуває стійкості до антимікробних препаратів, тому колись досить ефективна терапія антибіотиками стає малоефективною, а тварин необхідно вибраковувати. Зацікавленість до використання фагів як протимікробних препаратів збільшується не тільки зі сторони гуманної, але і ветеринарної медицини. Фаги є ефективним мікробіологічним інструментом, здатним боротися зі специфічними штамми бактерій, що спричиняють інфекційні захворювання. Проте, важливими складовими ефективної фаготерапії є виділення виключно літичних бактеріофагів та розробка технологічних параметрів при створенні препаратів для лікування тварин. Вважаю, що ця праця є своєчасною та виконана на актуальну тему.

2. Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача. Текст дисертації викладений на високому рівні наукового письма і в логічному порядку. Усі поставлені завдання були направлені на теоретичне та експериментальне обґрунтування розробки фагового препарату, літичного до збудника маститу корів *S. aureus variant bovis* та на проведення його комплексної фармако-токсикологічної оцінки. Для кожного із завдань було реалізовано адекватні дизайни досліджень, які склалися з трьох етапів – аналізу антибіотиків та внутрішньоцистернальних протимаститних препаратів, які використовують для лікування маститу корів; виділення та дослідження бактеріофагів для створення протимаститного препарату специфічного щодо *S. aureus var. bovis*; визначення технологічних параметрів для створення препарату і використання Фагомасту з лікувальною метою у корів, хворих на мастит.

Отримані результати оформлені з вказанням статистичних методів обробки та достовірностей. На основі отриманих результатів розроблено

бактеріофаговий препарат Фагомаст, який загальному не поступається традиційним методам лікування із застосуванням препаратів-антибіотиків. Однак, значною перевагою під час фаготерапії маститу є значно менший термін вибраковування молока за рахунок відсутності у ньому залишкових кількостей антибіотиків, попередження розвитку антибіотикорезистентності у збудників захворювання та одержання екологічно безпечного молока.

Кожен з розділів власних досліджень підкріплений публікаціями в моноавторстві здобувачки та з колективом авторів. Всього за темою дисертаційної роботи опубліковано 37 наукових праць, з них 16 у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України, 7 статей у періодичних виданнях, включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України, або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, 2 деклараційних патенти України на корисну модель, 9 тез конференцій, 2 методичні рекомендації, 1 Технічні умови України. Результати дослідження опубліковані в рецензованих журналах високого рівня. Результати роботи були представлені і продискутовані на українських і міжнародних конференціях.

Науковий рівень даної дисертаційної роботи та підтверджуючих її публікацій відповідає високим критеріям ступеня доктора ветеринарних наук.

3. Новизна представлених теоретичних та/або експериментальних результатів проведених здобувачкою досліджень, повнота викладу в опублікованих працях. Результати дисертаційного дослідження несуть наукову новизну щодо вивчення фармакодинаміки та біотехнологічних підходів при розробці препаратів на основі бактеріофагів, специфічних до збудників маститу корів. Розроблено внутрішньоцистернальний препарат Фагомаст для профілактики та лікування маститу корів як альтернативу антибіотикам.

Науково доведено, що DL_{50} Фагомасту становить більше 5000 мг/кг маси тіла тварин. Препарат не володіє кумулятивними, сенсibiliзуювальними властивостями, не викликає подразнення, нетоксичний при пероральному попаданні в живий організм та не впливає на зміну морфологічних показників крові лабораторних тварин. До того ж, не спричиняє місцево-подразнювальної дії на слизові оболонки очей кроля. Встановлено, що за концентрації фагів від 10^4 до 10^9 БУО/см³ у препараті зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не виявлено. За встановленими фармакологічними ознаками препарат Фагомаст віднесено до IV класу (малотоксичні) безпечності.

Уперше розроблено методологію виділення та дослідження властивостей штамів бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах. До того ж, виділено та досліджено біологічні властивості високолітичного штаму бактеріофагу *Phage SAvB14*. Встановлено, що *Phage SAvB14* проявляє високу літичну активність щодо *Staphylococcus aureus var. bovis*, утворює прозорі з чіткими краями бляшки розміром 1 – 2 мм, стійкий до впливу високих температур, хлороформу та коливань рН середовища, має короткий латентний

період із формуванням високого титру нових віріонів. *Phage SAvB14* ефективно проникає у матрикс біоплівки та знищує плівкоутворювальні збудники маститу *S. aureus var. bovis* і може бути використаний сукупно з антибіотиками. Штам бактеріофага *Phage SAvB14* первинно задепонований у колекції мікроорганізмів Національного центру штамів мікроорганізмів України за номером 737 (Свідоцтво на штам від 05.03.2019 року). Крім того, наукову новизну підтверджено деклараційним патентом України на корисну модель № 139981 «Бактеріофаг *phage SAvB14* для ветеринарної мікробіології».

Значно розширено та поглиблено знання щодо патогенних властивостей основних збудників маститу у корів на молочних фермах України. Встановлено, що серед збудників як гострої, так і хронічної форм маститу найбільшою плівко- та токсиноутворювальною здатністю володіють штами *S. aureus*. Крім того, вони є великим резервуаром генів резистентності до антимікробних препаратів, у тому числі стійкості до метициліну, які в процесі одержання молока можуть його забруднювати та передаватися людям. Виявлено, що препарати на основі бактеріофагів промислового виробництва неефективні щодо культур золотистих стафілококів, виділених з молочних продуктів та від корів, хворих маститом.

Ідентифіковано та первинно задепоновано штам *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f*, який є типовим збудником маститу в корів (Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії ДНКІБШМ № 736 від 05.03.2019 року), наукова новизна підтверджена деклараційним патентом України на корисну модель № 137461 «Штам *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f* для ветеринарної мікробіології».

4. Наукова обґрунтованість отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Ретельне вивчення матеріалів дисертації Горюк Ю. В., поданої на захист та її публікацій дає підстави стверджувати, що отримані результати, висновки, сформульовані положення базуються на достатньому експериментально підтвердженому матеріалі. Достовірність базується на різноплановому і повному аналізі даних з використанням відповідних завдань і даних статистичних методів.

Для досягнення поставленої мети і розв'язання поставлених завдань авторка розробила адекватний дизайн досліджень та етапи та їх виконання. В дослідженнях використовувались сучасні методи досліджень – токсикологічні, фармакологічні, мікробіологічні, гематологічні, біохімічні, клінічні, електронно-мікроскопічні, статистичні.

Дослідження ґрунтується на перевірених методиках та підходах, підтверджених публікаціями інших наукових груп, має сильну методологічну основу та не викликає сумнівів. Отримані висновки відображають завдання дисертаційного дослідження, мають наукове, теоретичне та практичне значення. Розділи, що містять результати власних досліджень і базованих на них положень закінчуються висновками, що лаконічно передають суть розділів.

5. Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачкою методологією наукової діяльності. Горюк Ю. В. показала високий рівень наукового підходу до поставлених завдань, глибоке розуміння проблематики, спроможність самостійно планувати та вирішувати наукові завдання.

Здобувачкою проведено патентний пошук, огляд літератури з обраної теми, розроблено програму та етапи наукових досліджень, сформульовано мету і завдання та відпрацьовано методики експериментальних досліджень. Проведено виробничі та лабораторні дослідження. Проаналізовано та узагальнено отримані наукові результати та проведено їх статистичний аналіз.

6. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження. Дисертаційну роботу виконано в Закладі вищої освіти «Подільський державний університет» на факультеті ветеринарної медицини і технологій у тваринництві за ініціативною тематикою «Теоретичне та експериментальне обґрунтування впливу бактеріофагів на планктонні та біоплівкові форми бактерій у системі одержання екологічно безпечного молока», номер державної реєстрації 0119U001356.

У дисертаційній роботі науково обґрунтовано та розроблено препарат Фагомаст на основі бактеріофагів для лікування корів за стафілококового маститу. Використання препарату Фагомаст на молочних фермах для лікування корів за виникнення маститу дозволить, з одного боку, ефективно ліквідовувати основного збудника маститу золотистого стафілококу, з іншого – зменшить використання антибіотиків у молочному тваринництві. До того ж, попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, потрапляння залишкових кількостей антибіотиків у молоко, що дозволяє одержувати екологічно безпечне молоко. Результати викладені в методичних рекомендаціях «Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату Фагомаст», затверджені науково-методичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

На основі проведених досліджень для профілактики та лікування корів за виникнення маститу різних форм запропоновано внутрішньоцистернальний препарат Фагомаст на основі бактеріофагу *Phage SAvB14* (технічні умови України 21.2–22769675–001:2022).

Впроваджені в практику методології виділення та дослідження бактеріофагів, які дозволять забезпечити відбір виключно вірулентних штамів, специфічних щодо *S. aureus var. bovis* – основного збудника маститу корів. Результати викладені в методичних рекомендаціях «Виділення бактеріофагів *S. aureus var. bovis* на молочних фермах та визначення їх літичної активності», затверджені науково-методичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

7. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому. Рукопис дисертаційної роботи написаний відповідно до вимог, які регулюють

написання дисертацій, має відповідну структуру. Рукопис представлений за класичною структурою, викладений на 366 сторінках друкованого тексту. Основні розділи дисертації представлені у вигляді анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, чотирьох підрозділів власних досліджень, аналізу і узагальнення отриманих результатів, висновків, бібліографії та додатків. Бібліографія складається з 591 джерел, з яких 27 кирилицею та 564 латинським шрифтом. Дисертаційна робота має достатньо ілюстрованого матеріалу для пояснення і візуалізації отриманих результатів.

Анотація складається зі стислого переказу основних пунктів дисертаційного дослідження.

У **вступі** (с. 27–36) описано актуальність досліджуваної проблеми, вказано зв'язок з іншими дослідницькими темами, сформульовану мету і завдання дослідження, наведено публікації, в яких викладено результати дослідження з вказанням вкладу дисертантки.

Огляд літератури (с.36–86) написаний кваліфіковано. Він складається з основних фактів, які є підґрунтям досліджуваної проблем, описує поточний стан досліджень на основі аналізу статей інших дослідницьких груп та дає інформацію про сучасні методологічні підходи розв'язання поставленого наукового завдання.

У розділі **«Вибір напрямів досліджень. матеріали та методи досліджень»** (с. 86-102) авторка вичерпно викладає і обґрунтовує методику і дизайн досліджень, методи статистичної обробки результатів дослідження. Наведено детальний опис і обґрунтування використаних моделей та експериментальних груп тварин. Описані сучасні методи дослідження, які були використані здобувачкою.

У розділі **«Результати власних досліджень»** (стр.102-228), який містить чотири підрозділи описано власне результати проведених експериментальних досліджень. Так, у підрозділі 3.1. «Аналіз антибіотиків та протимаститних препаратів щодо впливу на збудники маститу» описано поширення маститу у корів, чутливість планктонних і плівкоутворювальних бактерій – збудників маститу до антимікробних препаратів, встановлено мінімальну бактерицидну концентрацію антибіотиків щодо *S. aureus* у біоплівці та планктонній формі, стійкість стафілококів до метициліну. Ці факти підкреслюють необхідність пошуку, розробки та впровадження нових альтернативних антибіотикам засобів боротьби з маститами у корів, особливо стафілокової етіології.

В основу підрозділу 3.2. «Обґрунтування вибору діючої речовини для створення препарату на основі бактеріофагів» лягли дослідження з обґрунтування використання літичних бактеріофагів для створення протимаститного препарату специфічного щодо *Staphylococcus aureus variant bovis*, вплив промислових препаратів бактеріофагів на культури золотистого стафілококу різного біологічного походження, виділення бактеріофагів *Staphylococcus aureus variant bovis* на молочних фермах та дослідження впливу фізико-хімічних чинників на фармакологічно-літичну активність фагів.

Підрозділ 3.3. містить результати з доклінічних випробувань новоствореного препарату Фагомаст. Розробку технологічних параметрів виготовлення і контролю препарату на основі бактеріофагів для профілактики та лікування корів за маститу, визначення його токсикологічних властивостей та вплив на організм лабораторних тварин.

І останній підрозділ 3.4. «Клінічні випробування новоствореного препарату Фагомаст і порівняльна характеристика з існуючими протимаститними препаратами» описує ефективність застосування Фагомасту при лікуванні тварин за субклінічного та клінічного маститів, його вплив на кількість золотистого стафілококу та кількість соматичних клітин в молоці. Доведено, що лікування бактеріофаговим препаратом Фагомаст в загальному не поступається традиційним методам із застосуванням препаратів-антибіотиків. Однак значною перевагою під час фаготерапії маститу є значно коротший термін вибраковування молока, за рахунок відсутності у ньому залишкових кількостей антибіотиків.

Опис отриманих власних результатів підсумовується в розділі «**Аналіз і узагальнення результатів дослідження**» (с. 228–265), в якому авторка дискутує і порівнює отримані дані з наявними концепціями і гіпотезами, що стосуються використання фаготерапії при маститах у корів. Розділ написаний грамотно і кваліфіковано.

Висновки логічно витікають з результатів і їх узагальнення, сформульовані коротко, містять вичерпну і найбільш суттєву інформацію, отриману в процесі дослідження.

Реферат за змістом є коротким відображенням дисертаційної роботи та відповідає вимогам, визначеними спеціалізованою вченою радою.

8. Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці. У практичній площині це дослідження знайде застосування по наступних напрямках:

1. Запропонований здобувачкою спосіб профілактики та лікування корів за маститу, спричинених *S. aureus var. bovis* є ефективним методом боротьби з цим захворюванням.

2. Для забезпечення ефективної фаготерапії при профілактиці та лікуванні корів за маститу різних форм, спричинених *S. aureus var. bovis*, необхідно проводити комплексну діагностику запалення вимені у корів, враховуючи патогенні властивості збудників, їх антибіотикостійкість та чутливість до комерційних фагових препаратів.

3. Для виділення та дослідження виключно високолітичних бактеріофагів, специфічних щодо *S. aureus var. bovis*, використовувати методичні рекомендації «Виділення бактеріофагів *S. aureus var. bovis* на молочних фермах та визначення їх літичної активності», затверджені науковометодичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

4. При створенні препарату на основі бактеріофагів для лікування корів за маститу необхідно враховувати біологічне походження штамів фагів, їх

літичну активність, стійкість до впливу факторів навколишнього середовища, спектр антибактеріальної дії, антибіоплівкову активність та взаємодію з іншими антибактеріальними препаратами.

5. Для профілактики та лікування маститу використовувати внутрішньоцистернальний препарат Фагомаст ТУ У 21.2–22769675–001:2022 відповідно до методичних рекомендацій «Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату Фагомаст», затверджені науковометодичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

9. Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувачки. Зауваження щодо оформлення і змісту дисертації не є принциповими і не впливають на загальну оцінку роботи. Під час наукової дискусії хотілося би почути думку дисертантки з таких питань:

– Які види терапії та які препарати найчастіше використовували в господарствах для лікування корів за маститу?

– У своїй роботі Ви стверджуєте, що розроблений препарат Фагомаст попереджує розвиток антибіотикостійкості у бактерій та потрапляння залишків антимікробних препаратів у молоко. Чи можна використовувати розроблений вами препарат для лікування тварин при органічному веденні тваринництва?

– У своїх дослідженнях Ви повідомляєте про значно вищу стійкість до антибіотиків мікроорганізмів, які перебувають у складі біоплівки. Поясніть, будь ласка, чому так відбувається?

– У першій частині власних досліджень Ви зазначаєте, що основними збудниками маститу у корів є бактерії роду *Streptococcus* та *Staphylococcus*, які Ви виділяли майже в однакових кількостях. Чому подальші дослідження були зосереджені саме на *S. aureus var. bovis*?

– Чим можна пояснити нині високий інтерес до використання бактеріофагів при лікуванні бактеріальних захворювань у тварин? Назвіть переваги фаготерапії над антибіотикотерапією.

– У дисертаційній роботі описано декілька штамів бактеріофагів, обґрунтуйте вибір штаму *Phage SAvB14* для створення препарату Фагомаст.

– Ви вивчали вплив бактеріофагів на бактерії, які перебувають у складі біоплівки. Поясніть високу фармако-літичну активність фагу *Phage SAvB14* на бактерії у складі біоплівки.

– Які речовини входять до складу препарату Фагомаст?

– Ви описуєте значну терапевтичну ефективність препарату Фагомаст за субклінічного та клінічного маститу. Чи можна використовувати Фагомаст для профілактики цього захворювання?

Слід відмітити, що у дисертації по тексту трапляються неprincipові поодинокі технічні та орфографічні неточності, вирази, які пов'язані з оформленням роботи. В той же час незважаючи на дрібні недогляди при друкуванні, дисертація є закінченою науковою роботою. Наявні окремі запитання і зауваження не є принциповими і не зменшують наукової цінності

та проблемного значення виконаної роботи. Вони не знижують актуальність, наукову новизну та практичну значимість дисертаційної роботи. Сподіваємось, що висловлені запитання та зауваження сприятимуть подальшому науковому росту і вдосконаленню авторки дисертації.

10. Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності. Під час ознайомлення з матеріалами дисертації та аналізу наукових публікацій здобувачки фактів академічного плагіату не виявлено. Наявності порушень академічної доброчесності в дисертаційному дослідженні Горюк Ю. В. не виявлено.

11. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Аналіз дисертації, реферату, і наукових праць, опублікованих за темою дисертації дозволяє зробити висновок, що дисертаційна робота на тему: «Обґрунтування, розробка та застосування бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит» є цілісною науковою працею, яка оформлена відповідно до вимог наказу Міністерства освіти і науки України №40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій», відповідає вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 року №1197, а її авторка Горюк Юлія Вікторівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія.

Офіційний опонент:

доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії бактеріологічного контролю якості і безпечності ветеринарних препаратів Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок



I. М. Кушнір

Підпис Кушніра І. М. засвідчую:

Начальник віділу кадрів ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок



I. І. Довгопола

м. Львів, 03 квітня 2023 р.



ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ім. С.З.Гжицького	
№	27-33
“ 06 ”	04 2023
м. Львів, вул. Пекарська, 50	