РЕЦЕНЗІЯ

доктора медичних наук, завідувача кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного медичного університету імені О.О. Богомольця Хайтовича Миколи Валентиновича на дисертаційну роботу Гринзовської Анастасії Анатоліївни «Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів», представлену на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань І «Охорона здоров'я та соціальне забезпечення» за спеціальністю І2 «Медицина».

Актуальність обраної теми.

Актуальність обраної теми дисертаційної роботи визначається загрозливими тенденціями у сфері протигрибкової терапії та зростанням резистентності патогенних грибів до антимікотиків. У 2022 році Всесвітня організація охорони здоров'я вперше в історії оприлюднила перелік грибкових патогенів, що становлять найбільший ризик для здоров'я людини. Серед них особливе занепокоєння викликають *Aspergillus fumigatus* та *Candida albicans* — основні збудники важких мікозів, з високим рівнем смертності, який, наприклад, у випадку *Candida albicans* в Європі сягає 43% протягом 90 днів після інфікування.

Проблема ускладнюється тим, що стійкість грибів до антимікотиків формується не лише внаслідок медичного застосування препаратів, а й через вплив аграрних фунгіцидів, хімічно подібних до лікарських засобів. Масове використання таких фунгіцидів у сільському господарстві створює селекційний тиск на мікрофлору, сприяючи поширенню стійких штамів, які згодом можуть інфікувати людей.

У 2025 році європейські регуляторні структури об'єднали зусилля у рамках концепції «One Health» для боротьби з резистентністю *A. fumigatus* до азолів, що ще раз підтверджує масштабність проблеми. Виявлення мутацій у гені *cyp51A*, зокрема TR34/L98H, які раніше були притаманні лише ізолятам з довкілля, а нині дедалі частіше зустрічаються у клінічних штамах, свідчить про міжсередовищний перенос стійкості.

Таким чином, тема дослідження є надзвичайно актуальною, оскільки стосується не лише фундаментальних аспектів мікробіології, але й безпосередньо впливає на ефективність лікування грибкових інфекцій та потребує термінового наукового й нормативного реагування. Вирішення даних питань і стало задачею дисертаційного дослідження аспірантки Гринзовської Анастасії Анатоліївни.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана на базі Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, (Madrid, Spain), на базі Інституту гігієни та екології та в науково-дослідній бактеріологічній лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Навчально-наукового інституту профілактичної медицини та громадського здоров'я Національного медичного університету імені

О.О. Богомольця (Київ, Україна), є фрагментом госпдоговірних науково-дослідних робіт № держреєстрації: 0122U200344, 0122U200343, 0122U002347.

Робота виконана відповідно до законів України «Про пестициди і агрохімікати» від 2 березня 1995 року № 86/95-ВР, «Про безпечність та якість харчових продуктів» від 23 грудня 1997 року № 771/97-ВР, «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» від 24 лютого 1994 року № 4004-XII.

Результати оцінки наукового рівня дисертації та публікацій

Оцінка структури, змісту та форми дисертації. Оцінюючи зміст дисертаційної роботи, необхідно зазначити, що дисертація має традиційну структуру та складається зі вступу, розділів, які включають огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, результати власних досліджень, їх аналіз і узагальнення, висновків, 1 додатку. Загальний обсяг дисертації – 158 сторінок. Дисертаційна робота ілюстрована 33 рисунками, цифровий матеріал зведений до 18 таблиць. Список використаних літературних джерел включає 154 найменування.

У вступі представлені дані про актуальність дослідження, мету, завдання, предмет, об'єкт дослідження, методи дослідження, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

В огляді літератури Гринзовська А.А. провела всебічний науковий аналіз вітчизняних та зарубіжних літературних джерел про сучасний стан проблеми поширення антимікотикорезистентних штамів. Описано зростання захворюваності на грибкові інфекції та підвищення стійкості збудників до протигрибкових препаратів як в Україні, так і у світі. Наголошено, що *Candida albicans*, *A. fumigatus*, *C. glabrata* та інші види мають клінічне значення через високі показники смертності при інвазивних мікозах, а також дедалі частіше фіксується неефективність стандартної терапії через резистентність. Розглянуто молекулярні механізми, які лежать в основі стійкості грибів до препаратів — мутації в генах, зокрема *cyp51A*, зміни експресії цільових білків, активація ефлюкс-систем. Окрема увага приділена мутаціям TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A, які пов'язані з пан-резистентністю *A. fumigatus* до азолів. В огляді окреслено підходи до зменшення ризику поширення резистентних форм — від розробки нових протигрибкових засобів до зміни політики у сфері використання аграрних фунгіцидів. Наголошено на важливості інтеграції підходів у межах концепції «One Health», що визнає зв'язок між здоров'ям людини, тварин і довкілля. Таким чином, огляд літератури обґрунтовує актуальність теми, демонструє прогалини у знаннях та підкреслює необхідність дослідження зв'язку між аграрними фунгіцидами і формуванням антимікотикорезистентності у клінічно значущих грибів.

Розділ 2 містить деталізовану програму досліджень, виконання якої сприяло вирішенню поставлених мети та завдань дослідження. Наведені у цьому розділі дані свідчать про адекватність запланованих методів дослідження меті та завданням дисертації.

Розділ 3. Представлено результати порівняльного дослідження чутливості грибів *Aspergillus fumigatus*, ізольованих як з клінічного матеріалу, так і з об'єктів навколишнього середовища. Авторкою проведено аналіз 401 клінічного ізолята та 1400 зразків довкілля, серед яких виділено 378 клінічних та 446 екологічних штамів *A. fumigatus*. Було встановлено, що частка резистентних до азолів клінічних ізолятів становила 3,4%, тоді як серед ізолятів з довкілля цей показник сягав 10,98%. У клінічних ізолятах переважала резистентність до ітраконазолу та позаконазолу, а також часткова — до вориконазолу й ізавуконазолу. Встановлення мутації TR34/L98H у 75,5% панрезистентних ізолятів довкілля, а також її наявність у клінічних штамах, свідчить про можливий перехід резистентності з довкілля в клінічне середовище. Типування ізолятів методом TRESPERG показало наявність однакових генотипів серед чутливих і резистентних штамів, що підтверджує зв'язок між аграрним та медичним середовищами.

Розділ 4. В даному розділі дисертанткою наведено чутливість штамів грибів роду *Candida* до аграрних фунгіцидів, зокрема дифеноконазолу, тебуконазолу, флуатріафолу, імазалілу, прохлоразу та пропіконазолу. Використовуючи метод серійних розведень, авторка визначила середні мінімальні фунгіцидні концентрації для кожного із досліджуваних штамів. Для вивчення механізмів формування резистентності було проведено пасажування клінічних штамів *Candida albicans*, *C. glabrata* та *C. krusei* у середовищах із вищевказаними фунгіцидами. У результаті багаторазового пасажування спостерігалося формування стійкості до аграрних фунгіцидів та супровідні морфологічні зміни, що підтверджено світловою та електронною мікроскопією.

Розділ 5 присвячений вивченню змін чутливості грибів роду *Candida* до медичних антимікотиків після їх адаптації до аграрних фунгіцидів. Зокрема, проаналізовано хімічну спорідненість між сільськогосподарськими фунгіцидами та медичними препаратами груп імідазолів, триазолів і полієнів. За допомогою диско-дифузійного методу (CLSI) авторка оцінила чутливість вихідних і пасажованих штамів до міконазолу, клотримазолу, флуконазолу, вориконазолу та ністатину. У результаті встановлено як випадки перехресної резистентності до медичних азолів, так і підвищення чутливості у деяких штамів порівняно з вихідними. Статистичний аналіз продемонстрував достовірність змін ($p<0,0001$), що свідчить про здатність аграрних фунгіцидів індукувати або модифікувати чутливість грибів до клінічно важливих антимікотиків.

Розділ 6 Аналіз і узагальнення результатів досліджень всебічно проаналізовані та узагальнені отримані результати.

У висновках дисертаційної роботи автор підсумовує отримані ним результати. Висновки до дисертаційної роботи відображають усі закономірності, що витікають з результатів роботи та статистично підтверджені.

Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових і фахових виданнях.

Результати дисертаційного дослідження повністю висвітлені в опублікованих дисертанткою наукових роботах. Загалом за темою дисертації опубліковано 17 наукових робіт: 6 статтей у фахових наукових виданнях України, що віднесені до категорії Б, та 1 стаття в іноземному періодичному виданні, що індексується в базі даних Scopus (Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports.). Додатково, аспірантом опубліковано 10 тез апробаційного характеру у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Основні наукові результати були викладені і обговорені наступних наукових науково-практична конференція з міжнародною участю до 100-річчя кафедри гігієни, безпеки праці та професійного здоров'я НМУ імені О.О. Богомольця та всесвітнього дня безпеки пацієнтів 2023 року «Актуальні проблеми безпеки і гігієни лікарень, персоналу» (Київ, 2023); III Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, 2023); науково-практична конференція з міжнародною участю «Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини» (Київ, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024; 2025); Міжнародна науково-практична конференція «Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини» (Полтава, 2023).

Даному питанню були присвячені семінари: презентація на Seminario del Programa de Mentores від ISCIII, з тематикою «Alta prevalencia de *A. fumigatus* resistente a azoles en muestras de aire ambiental» 16 березня 2023 року (Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain); презентація на Seminario del Programa de Mentores від ISCIII, з темою «Another threat of antifungal resistance: Crossover between the environment and clinical *A. fumigatus*» 22 лютого 2024 року (Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain); постерна доповідь на тему «Antifungal Resistance in *A. fumigatus*: Environmental Conditions & Clinical Implications» Molecular Mechanisms of Host-pathogen Interactions and Virulence in Human Fungal Pathogens 18-24 травня 2024, La Colle sur Loup, France; постерна доповідь онлайн На тему «Antifungal Resistance in *A. fumigatus*: Environmental Conditions & Clinical Implications» під час Microbiology Week Virtual Event Series 2024, 03-05 вересня 2024 року; постерна доповідь онлайн на тему «Prevalence of Azole Resistance Among *A. fumigatus* Isolates in Clinical and Environmental Samples» під час Clinical Diagnostics & Research Virtual Event Series 2024, 13 листопада 2024 року; постерна доповідь на тему «Emerging Pathogens in Colonizing Moulds: the Threat of Azole-Resistant *A. fumigatus*» під час Winter Immunology Symposium in Health, Alicante, Spain, 19-20 грудня 2024; постерна доповідь онлайн на тему «Antifungal Therapy and Pesticides: Is There a Connection?» під час Antimicrobial Chemotherapy Conference (ACC) 4 лютого 2025 року; постерна доповідь на тему «Prevalencia de la resistencia a azoles entre los aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus*» під час XVI Congreso Nacional de Micología 20-22 березня 2025 року,

Сарагоса, Іспанія; постерна доповідь на тему «Prevalencia de la resistencia a azoles entre los aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus*» під час SOMOS ISCIII 2025 2 та 9 квітня 2025 року, Мадрид, Іспанія.

Наукова новизна результатів проведених досліджень та їх наукова обґрунтованість

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає у комплексному дослідженні впливу аграрних фунгіцидів на формування резистентності у патогенних грибів, що мають клінічне значення. Вперше встановлено здатність штамів *Candida albicans*, *C. glabrata* та *C. krusei* формувати стійкість до діючих речовин низки сільськогосподарських фунгіцидів — дифеноконазолу, тебуконазолу, флуатріафолу, імазалілу та прохлоразу, а також виявлено закономірності розвитку цієї резистентності залежно від класу фунгіцидів.

Вперше на українському матеріалі проведено типування *Aspergillus fumigatus* методом TRESPERG та секвенування гена *cyp51A* у клінічних штамів із лікарні Universitario 12 de Octubre (Мадрид, Іспанія) і штамів із довкілля. Виявлено однакові генотипи серед чутливих і резистентних штамів, що підтверджує можливість передачі резистентності між екологічними та клінічними середовищами. Мутація TR34/L98H у клінічних ізолятах, раніше характерна лише для екологічних штамів, є прямим свідченням такого зв’язку.

Також науково обґрунтовано вплив адаптації *Candida spp.* до аграрних фунгіцидів на їхню чутливість до медичних антимікотиків. Виявлено як випадки перехресної резистентності, так і підвищеної чутливості, що дозволяє по-новому оцінити механізми стійкості грибів до терапії. Застосування сучасних методів мікроскопії, диско-дифузійного тестування та статистичного аналізу забезпечило високу достовірність отриманих результатів.

Оцінка рівня виконання поставленого наукового завдання та рівня оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

Усі положення та висновки дисертації добре аргументовані та підтверджені конкретними фактичними матеріалами. Дисертаційні дослідження проведені на достатньо високому науково-методичному рівні, про що свідчить їх адекватне планування, застосування сучасних методів дослідження, значні обсяги отриманих фактичних даних. Отримані при проведенні досліджень цифрові дані були піддані математичній обробці з використанням методів варіаційної статистики з розрахунком середнього арифметичного значення, дисперсії, середнього квадратичного відхилення та похибки, оцінки достовірності розходжень.

Дисертація Гринзовської А.А. «Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів», представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD), є завершеною працею, в якій вирішено важливе завдання медицини, а саме: встановлено зв’язок між застосуванням аграрних фунгіцидів і формуванням резистентності у клінічно значущих грибів до медичних антимікотиків, що дозволило науково обґрунтувати необхідність перегляду підходів до регулювання використання фунгіцидів, запровадження генотипування патогенів та впровадження

ризик-орієнтованих стратегій у сфері протигрибкової терапії й санітарного нагляду відповідно до концепції «One Health».

За результатами дисертаційного дослідження було сформовано 6 висновків, які в повній мірі розкривають завдання дослідження. Усі наукові положення, висновки та практичні рекомендації, що базуються на результатах проведеного аспірантом дослідження, є обґрунтованими та достовірними.

Практичне значення отриманих результатів.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що проведене дослідження надало нові науково обґрунтовані дані, які мають безпосереднє застосування у медичній, мікробіологічній та санітарно-епідеміологічній практиці. Вперше експериментально доведено, що аграрні фунгіциди можуть спричиняти розвиток перехресної резистентності у грибів *Aspergillus fumigatus* та *Candida spp.* до клінічно важливих антимікотиків. Це дозволяє не лише глибше зрозуміти механізми формування стійкості, а й використовувати результати для удосконалення лікувальних підходів.

Запропоновані в роботі молекулярно-генетичні методи, зокрема генотипування *A. fumigatus* методом TRESPERG і виявлення мутацій у гені *cyp51A*, можуть бути впроваджені у практику діагностичних лабораторій для своєчасного виявлення резистентних штамів. Це, у свою чергу, дає змогу оперативно коригувати протигрибкову терапію.

Результати дослідження також мають значення для обґрунтування змін у нормативній базі щодо використання аграрних фунгіцидів, формування локальних протоколів лікування грибкових інфекцій, розробки національної програми *Antifungal Stewardship*, а також для створення системи моніторингу антимікотикорезистентності, що відповідає сучасним вимогам концепції «One Health». Реалізація таких підходів сприятиме підвищенню ефективності терапії, зниженню рівня резистентності та гармонізації національної системи охорони здоров’я з міжнародними стандартами.

Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності. При детальному розгляді дисертаційної роботи порушень академічної доброчесності (академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації) не було виявлено.

Висновок

Дисертаційна робота Гринзовської Анатасії Анатоліївни «Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів», подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії, є самостійною завершеною науковою працею, що виконана дисертантом особисто, має значну наукову новизну, теоретичне та практичне значення.

Аспірантці вдалось досягнути мети дослідження, виконати всі задачі дослідження та зробити відповідні висновки. Загальна оцінка дисертації – позитивна.

Основні наукові результати дисертаційного дослідження висвітлені в достатній кількості наукових публікацій, які повністю розкривають зміст дисертації.

Дисертаційна робота Гринзовської Анатасії Анатоліївни «Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів» за актуальністю обраної теми, методичним рівнем виконання, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів для медицини повністю відповідає вимогам п. 6 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, актуальним вимогам до оформлення дисертацій, затвердженим наказом № 40 Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року (редакція від 12.07.2019).

Матеріал в дисертації викладено послідовно, чітко, логічно, що створює позитивне враження від роботи.

Оцінюючи дисертаційну роботу Гринзовської А.А. в цілому позитивно, виникли запитання:

1. Яким чином авторка оцінює потенційну можливість зворотного процесу — зниження резистентності грибів після припинення впливу аграрних фунгіцидів?
2. Чи враховано у дослідженні регіональні особливості застосування фунгіцидів, які могли б впливати на поширеність резистентних штамів у довкіллі?

Зазначені запитання не зменшують наукової новизни та практичної значимості роботи і тому не є перешкодою для її позитивної оцінки в цілому.

Враховуючи актуальність роботи, її практичну направленість, повне розкриття поставлених завдань, відповідність висновків отриманим результатам, адекватність методичних підходів поставленим завданням, широке відображення матеріалів дисертації у журналах, що входять до фахових наукових видань України, та обговорення на конференціях, відповідність структури рукопису існуючим офіційним вимогам, вважаю, що дисертаційна робота Гринзовської Анастасії Анатоліївни виконана в запланованому об’ємі, відповідає вимогам щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров’я» за спеціальністю 222 «Медицина» та рекомендується до офіційного захисту.

Рецензент:
Завідувач кафедри клінічної фармакології
та клінічної фармації Національного
медичного університету імені О.О. Богомольця
доктор медичних наук, професор **Микола ХАЙТОВИЧ**