

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора кафедры педиатрии и неонатологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Гончар Натальи Васильевны на диссертационную работу Маханёк Анны Алексеевны на тему «Клиническая характеристика недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *Klebsiella pneumoniae* с различным генетическим профилем», представленной к защите в диссертационный совет 21.2.062.02 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.21.

Педиатрия

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор, з.д.н. РФ Чистякова Гузель Нуховна

Актуальность темы диссертации. Содержание работы Маханёк А.А. посвящено изучению особенностей течения неонатального периода у недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae* с разным набором генов. *K. pneumoniae* представляет собой грамотрицательный условно-патогенный микроорганизм семейства *Enterobacteriaceae*, который входит в состав нормального микробиоценоза кишечника, но при этом обладает значимым патогенетическим потенциалом для развития оппортунистических инфекций у новорожденных детей. Следствием колонизации кишечника *K. pneumoniae* может быть развитие инфекционного процесса, реализация которого зависит от уровня защиты слизистой оболочки кишечника, иммунологической реактивности ребенка, факторов резистентности и вирулентности микроорганизма. Современные исследования выделяют следующие факторы вирулентности *K. pneumoniae*, присутствующие у всех представителей данного вида, – капсула и липополисахарид, обеспечивающие защиту микроорганизма от системы комплемента и фагоцитов, а также высвобождение эндотоксина; фимбрии 1 и 3 типов, осуществляющие прикрепление и адгезию к слизистой оболочке



кишечника и участвующие в формировании биопленок; сидерофоры (энтеробактин, иерсиобактин, сальмохелин, аэробактин), связывающие ионы железа и импортирующие его в бактериальную клетку.

Колонизация кишечника *K. pneumoniae* в неонатальном периоде способна вызывать локальное воспаление слизистой оболочки, потенцируя возможность развития системных инфекционных процессов.

Многочисленные исследования свидетельствуют о значении вирулентных штаммов *K. pneumoniae* в патогенезе тяжелых неонатальных инфекций. В настоящее время в литературе описаны гены, кодирующие синтез факторов вирулентности, вносящих вклад в реализацию патогенного потенциала *K. pneumoniae*. Особую опасность представляют изоляты, экспрессирующие гены патогенности и достоверно ассоциированные с развитием жизнеугрожающих состояний у недоношенных новорожденных: неонатального сепсиса, некротизирующего энтероколита, гнойного менингита. Среди них пристального внимания заслуживают гипермукоидные штаммы, несущие гены *gmpA* и *gmpA2*, обладающие уникальной способностью к интенсивному биопленкообразованию и преодолению кишечного барьера, что существенно повышает вероятность гематогенной диссеминации инфекционного процесса., а также штаммы, несущие гены *ige*, *kfu*, *fim*. Ген *ige* хромосомной локализации, кодирующий синтез уридиндифосфатгалактуронат-4-эпимеразы, принимает участие в колонизации и инвазии штаммов *K. pneumoniae*. *Kfu* ген кодирует систему поглощения железа и связан с вирулентностью *K. pneumoniae*. Ген *fim* контролирует синтез фимбрий, нитевидных структур белковой природы, расположенных на поверхности бактерий и обеспечивающих адгезию штаммов бактерий к клеткам хозяина. И все же, как показывают результаты изучения гипервирулентности *K. pneumoniae* на септических моделях, перечень патогенных маркеров включает около двух десятков генов, но ни один из них не обладает 100% специфичностью.

Очевидно, что обнаружение генетических детерминант вирулентности штаммов *K. pneumoniae* у новорожденных, может быть одним из решающих факторов при выделении групп повышенного риска инфицирования для разработки персонализированных схем ведения, обследования и лечения пациентов. Однако манифестацию инфекционно-воспалительных процессов в неонатальном и последующих периодах жизни ребенка в значительной степени провоцируют и эндогенные причины, такие, как нарушение микробиоценоза кишечника, снижение функционального состояния факторов врожденного и мукозального иммунитета, обусловленных различными клиническими состояниями.

Из сказанного выше следует, что диссертационная работа Маханёк Анны Алексеевны, цель которой – определение наиболее информативных клинических и лабораторных показателей риска колонизации кишечника *Klebsiella pneumoniae* у недоношенных детей, весьма актуальна и современна.

**Степень новизны, обоснованности научных положений,
результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в
диссертации**

Диссертационная работа, выполненная Маханёк А.А., представляет собой оригинальное научное исследование, в результате которого показано, что течение неонатального периода у детей с колонизацией кишечника *Klebsiella pneumoniae*, имеющих геноварианты вирулентности *uge*, связанного с продукцией компонентов клеточной стенки, и *fim*, отвечающего за синтез фимбрий, характеризуется низкой оценкой по шкале Апгар, длительным пребыванием на респираторной поддержке, неонатальной желтухой, анемией, функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, а также снижением уровня гемоглобина, эритроцитов, гематокрита в гемограмме, снижением глюкозы и повышением общего и непрямого билирубина, мочевины в сыворотке крови. Впервые определено, что среди штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у недоношенных новорожденных,

распространены следующие генетические комбинации: *uge* в 21,8%, *uge + fim* – в 50,9%, *kfu*, обеспечивающий конкурентоспособное поглощение и использование ионов железа в сочетании с комбинацией *uge + fim* (*kfu+uge+fim*) – в 27,3%. Автором установлено, что наличие комбинаций генов *uge+fim* и *kfu+uge+fim* способствует устойчивой колонизации *K. pneumoniae* в кишечнике у недоношенных детей вплоть до поздних сроков постнатального развития (что соответствует постконцептуальному возрасту 37–40 недель). Диссертантом обнаружено, что у детей в гестационном возрасте 28–36 недель 6 дней с колонизацией кишечника *K. pneumoniae* при рождении и по достижению постконцептуального возраста 37–40 недель, отмечается снижение в крови содержания моноцитов CD14+CD282+, экспрессирующих Toll-подобный рецептор 2 типа и CD14+CD284+, экспрессирующих Toll-подобный рецептор 4 типа, свидетельствующее о нарушении механизмов распознавания инфекционных патогенов, а также снижение содержания моноцитов CD14+CD11b+, отражающее сниженную готовность эффекторных клеток к участию в процессах межклеточного взаимодействия и пониженную способность к опсонизации микроорганизмов, снижение содержания моноцитов CD14+HLA-DR+, указывающее на уменьшение количества активированных моноцитов и на неполноценность их антигенпрезентирующей функции. Результаты исследования демонстрируют стойкий дефицит секреторного IgA, сохраняющийся от неонатального периода до постконцептуального возраста 37–40 недель, что подтверждает незрелость системы мукозального иммунитета. Автором установлены наиболее значимые критерии, позволившие в неонатальном периоде у детей, рожденных преждевременно, спрогнозировать высокий риск колонизации кишечника *K. pneumoniae*, а именно: абсолютное количество лейкоцитов, относительное число CD14+HLA-DR+ и CD14+CD11b+ моноцитов пуповинной крови.

В диссертационной работе Маханёк А.А. научная обоснованность представленных положений, выводов и практических рекомендаций

обеспечена рационально спланированным дизайном исследования, репрезентативным объемом клинического материала, применением современных методик анализа, строгими критериями отбора пациентов (недоношенные новорожденные с подтвержденной колонизацией кишечника *K. pneumoniae*). Основные положения изложены аргументированно и достоверно, полностью — отражают содержание проведенного диссертационного исследования. Полученные выводы представляют результат логического обобщения, вытекают из систематизированных данных, полностью соответствуют поставленным целям и задачам, подкреплены статистически значимыми результатами. Предложенные практические рекомендации имеют четкое научное обоснование и могут считаться полезными для практического применения.

Значимость для науки и практики результатов исследования

Результаты диссертационной работы Маханёк А.А. значимы для теоретической и практической педиатрии. В ходе исследования были уточнены сведения о течении неонатального периода и изменении уровня экспрессии активированных моноцитов CD14+CD282+, CD14+CD284+, CD14+CD11b+, CD14+HLA-DR+ у недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae*. Разработанный алгоритм обследования учитывает клинико-anamnestические и лабораторные показатели, что обеспечивает точность прогнозирования и позволяет оптимизировать подходы к выхаживанию недоношенных новорожденных, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae*.

Достоверность и апробация результатов исследования

Научная работа выполнена на высоком методическом уровне. Все использованные автором методы соответствуют современным научным стандартам, обладают высокой информативностью, адекватны к поставленным исследовательским задачам. Проведённый объём исследований является репрезентативным и обеспечивает достоверность полученных результатов, возможность всестороннего решения

сформулированных научных задач, объективность сделанных выводов. Материалы работы широко представлены на всероссийских и международных конгрессах и форумах.

Разработанный алгоритм обследования недоношенных детей для прогнозирования колонизации *K. pneumoniae* в неонатальном периоде внедрен и используется в практике родового отделения, отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных, отделения патологии новорожденных и недоношенных детей ФГБУ «Уральского научно-исследовательского института охраны материнства и младенчества» Минздрава России (г. Екатеринбург) (протокол № 22 от 04.07.2024). Материалы диссертации используются в педагогическом процессе для обучения ординаторов на базе ФГБУ «Уральского научно-исследовательского института охраны материнства и младенчества» Минздрава России (Екатеринбург).

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 9 публикаций в изданиях из перечня ВАК, 4 из которых по специальности «Педиатрия»; получен 1 патент РФ на изобретение.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация имеет традиционную структуру, изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 162 источника (из них – 96 отечественных и 66 – зарубежных). Работа иллюстрирована 26 таблицами и 9 рисунками.

Во введении определена актуальность темы, цель и задачи исследования.

Задачи полностью соответствуют цели исследования и направлены на сравнительный анализ клинических, лабораторных и инструментальных данных у недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae* с разным генетическим профилем, на изучение структуры микробиоценоза толстой кишки, определение иммунологических параметров

(фенотипический состав моноцитов крови и секреторного IgA в копрофильтратах) при рождении и по достижению постконцептуального возраста 37-40 недель, на разработку математической модели прогнозирования колонизации кишечника *K. pneumoniae* в неонатальном периоде у детей, родившихся в гестационном возрасте от 28 до 36 недель 6 дней.

В первой главе представлен обзор научной литературы, в котором описаны клинические аспекты перинатальных осложнений и постнатальной заболеваемости новорожденных с нарушением микробиоты кишечника, особенности формирования желудочно-кишечного тракта недоношенного новорожденного, иммунный ответ и микробиоценоз кишечника у недоношенных детей, патогенные свойства *K. pneumoniae*, что отражает основные аспекты исследуемой темы. Материал изложен в логической последовательности хорошим литературным языком. Новизна материалов обзора подтверждают высокий уровень владения темой со стороны диссертанта.

Во второй главе автор описывает дизайн и методы исследования, представляет клинико-anamnestическую характеристику матерей, родивших недоношенных детей. Исследование построено по принципу проспективного сравнительного когортного обследования 90 недоношенных детей в гестационном возрасте от 28 до 36 недель 6 дней, составивших 4 группы в зависимости от гестационного возраста и колонизации кишечника *K. pneumoniae*, из которых 2 группы основные и 2 группы сравнения. Описаны критерии включения, исключения и невключения в исследование. Изложена методология, используемая при выполнении клинической части работы. Описаны методы статистической обработки данных исследования, которые соответствуют современным критериям и отражают достоверность полученных результатов. При статистических исследованиях автор использовала пакеты прикладных программ Microsoft Excel 2007 для Windows, Statistica 6.0, IBM SPSS Statistics 26.

В третьей главе изложены результаты, полученные диссертантом лично, посвященные изучению микробиологического пейзажа в отделении реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «Уральского научно-исследовательского института охраны материнства и младенчества» Минздрава России в период 2020-2022г, а также анализу клинических, лабораторных и инструментальных показателей у недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae* с разными комбинациями генов вирулентности – *uge*, *uge+fim*, *kfu+uge+fim*. Проанализирована длительность респираторной поддержки, антибактериальной терапии, структура заболеваемости. Изучена динамика состава микробиоценоза толстой кишки на протяжении всего периода наблюдения, в ходе которого установлено, что у детей основных групп наблюдалось уменьшение количества грамположительных микроорганизмов, и рост условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов. К достижению постконцептуального возраста 37-40 недель у недоношенных 1-й и 2-й групп частота выделения *K. pneumoniae* составляла 64% и 93,3% соответственно.

Результаты изучения фенотипического состава моноцитов крови и уровня секреторного иммуноглобулина А в копрофильтратах недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae*, показали значимое снижение экспрессии активированных моноцитов CD14+CD282+, CD14+CD284+, CD14+CD11b+, CD14+HLA-DR+, абсолютного количества лейкоцитов в гемограмме и секреторного иммуноглобулина А по сравнению с таковыми у детей без колонизации кишечника *K. pneumoniae*.

В результате проведенного исследования автором разработан способ прогнозирования риска колонизации кишечника *K. pneumoniae* у недоношенных новорожденных детей, основанный на исследовании иммунологических параметров, определяемых из пуповинной крови в первые сутки жизни, и предложен алгоритм обследования с учетом прогноза и данных бактериологического исследования фекалий на *K. pneumoniae*.

В заключении диссертации подведены основные итоги проделанной работы, что логично завершает диссертацию в целом. Выводы соответствуют цели и поставленным задачам, построены последовательно и подтверждены результатами.

Диссертация содержит тщательно разработанный иллюстративный материал (таблицы и рисунки, описание клинических случаев), который систематизирует полученные данные, наглядно демонстрирует ключевые закономерности, способствует лучшему восприятию представленной информации.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, отражает основные направления и полученные результаты исследования.

Замечания по диссертации

В целом, диссертационная работа Маханёк Анны Алексеевны, представляет собой завершённое научное исследование, изложена логично и последовательно, в научном стиле. Диссертационная работа выполнена и оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет.

Анализ работы позволил выявить незначительные недостатки, преимущественно связанные с немногочисленными опечатками в тексте, что не снижает общей ценности проведенного исследования.

В плане дискуссии считаю необходимым задать следующие вопросы:

1. Каково минимальное количество *K. pneumoniae*, обнаруженное при исследовании фекалий недоношенных новорожденных, соответствующее положительному результату в предложенном Вами алгоритме обследования?

2. Какие методы эрадикации колонизации кишечника *K. pneumoniae* у недоношенных новорожденных Вы считаете предпочтительными?

3. Что можно предложить в качестве средств повышения иммунитета при высоком риске колонизации кишечника *K. pneumoniae* у недоношенных новорожденных?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Маханёк Анны Алексеевны на тему «Клиническая характеристика недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *Klebsiella pneumoniae* с различным генетическим профилем» представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.21. Педиатрия, является научной квалификационной работой, в которой содержится решение крупной научной задачи – определение клинико-лабораторных маркеров, ассоциированных с высоким риском колонизации кишечника *K. pneumoniae* у недоношенных новорожденных.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Маханёк Анны Алексеевны соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в актуальной редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Маханёк Анна Алексеевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.21. – Педиатрия.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры педиатрии и неонатологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего

образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России)

д.м.н.



Гончар Наталья Васильевна

« 08 » _____ 10 _____ 2025г.

Подпись Гончар Н.В. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова

Минздрава России



Е.А. Трофимов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41.

Телефон: (812) 303-50-00.

E-mail: rectorat@szgmu.ru.

Официальный сайт: <https://szgmu.ru/rus/>.