

ВІДГУК

офіційного опонента

професора кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України, доктора медичних наук, професора Бірюкової Світлани Василівни на дисертаційну роботу О. В. Книш «Теоретичне та експериментальне обґрунтування нового напрямку створення метабіотиків на основі дериватів *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*», яка подана до спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

Актуальність теми дисертаційної роботи Книш О. В., присвяченої обґрунтуванню ефективності нового напрямку створення метабіотиків, не викликає сумніву. Вона зумовлена недостатньою ефективністю і безпечністю традиційних методів корекції мікроекологічних порушень та відсутністю постбіотичних препаратів вітчизняного виробництва на тлі масштабного поширення дисбіозів серед населення.

Життєдіяльність макроорганізму в певній мірі залежить від метаболічної активності чисельних видів мікроорганізмів, що формують різні біотопи, для яких організм людини являє означену екологічну нішу. Мікробіота є багатофункціональним своєрідним прокаріотичним органом і виконує чисельні функції, які стимулюють імунну систему та підтримують гомеостаз макроорганізму.

Мікроекологічний дисбаланс супроводжується порушенням мікробного метаболізму і механізмів вродженого та адаптивного імунітету. При цьому зміни

в одному з біотопів, як правило, призводять до порушення в інших. З усіх біотопів найбільша чисельність та різноманіття притаманні біотопу кишечника.

Нормальне співвідношення і функціонування складових кишкового мікробіому є обов'язковою умовою здоров'я людини. Порушення кишкового гомеостазу зустрічаються дедалі частіше і стали серйозною проблемою сучасної медицини, яка потребує вирішення. Однак, ефект від лікування клітинними пробіотиками часто короткотривалий, слабкий, а іноді – відсутній. В зв'язку з цим велика надія покладається на препарати постбіотичного ряду, що містять структурні компоненти і продукти метаболізму пробіотичних бактерій.

Проблемі подолання дисбіозу присвячена значна кількість досліджень. Впродовж останніх двох десятиліть традиційний метод був переглянутий і еволюціонував у концептуально новий – застосування постбіотичних продуктів (метабіотиків), що містять біологічно активні похідні пробіотичних бактерій. Метабіотики не потребують часу і певних умов для приживлення на слизових оболонках та нечутливі до дії антибактеріальних речовин. До їх переваг належать також: прогнозованість дії, мінімальний рівень антигенного навантаження на організм, відсутній ризик розповсюдження генів антибіотикорезистентності та можливість стандартизації засобу за певними біомолекулами.

Наразі асортимент лікувально-профілактичних засобів постбіотичного ряду представлений одним доступним лікарським засобом (Хілак форте). Позитивний досвід застосування Хілаку Форте підтверджує перспективність розробки і удосконалення пробіотичних засобів дериватного типу. Впродовж останніх двох десятиліть цей препарат залишається єдиним в Україні, зареєстрованим як лікарський засіб. Переважна більшість біологічно активних добавок (БАДів) закордонного виробництва, що містять метаболіти та структурні компоненти пробіотичних бактерій, відсутні на вітчизняному фармацевтичному ринку. Крім того, більшість з таких БАДів зазвичай отримують з використанням поживних середовищ, повністю позбутися залишків яких у кінцевому продукті практично

неможливо. Присутність компонентів поживних середовищ може бути причиною розвитку алергічних реакцій, суперечити вимогам біологічної безпеки та не задовольняти потреби споживачів. Отже, тему дисертаційної роботи Книш О. В., метою якої було теоретичне обґрунтування та розроблення нових підходів до створення метабіотиків на основі дериватів виробничих штамів *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 і *Bifidobacterium bifidum* 1, дослідження їх біологічних властивостей і ефективності застосування *in vivo* при експериментальному моделюванні інфекційного процесу у тварин на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу, слід вважати актуальною як в науковому, так і в практичному аспектах, та такою, що вирішує важливу медико-соціальну проблему національного масштабу.

Завершеність дисертаційного дослідження. Для досягнення поставленої мети дисертантом були визначені одинадцять завдань: розробити спосіб одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів *B. bifidum* 1 та *L. reuteri* DSM 17938; провести токсикологічний скринінг отриманих безклітинних екстрактів (БКЕ), визначити їх біохімічний склад, антиокислювальну та антирадикальну активність, здатність впливати на адгезію, проліферацію та біоплівкоутворення пробіотичних бактерій і патобіонтів; провести скринінг потенційних сполук-попередників при застосуванні пробіотичних культур *B. bifidum* 1 і *L. reuteri* DSM 17938 як систем біохімічної модифікації для підвищення інгібіторної активності безклітинних дериват-вмісних продуктів щодо патобіонтів, зокрема, їх антибіотикорезистентних ізолятів; оцінити імунотропні властивості БКЕ в експериментах *in vitro* та *in vivo*, а також здатність здійснювати протиінфекційний захист і корегувати мікроекологічні порушення *in vivo*.

Матеріали дисертації свідчать про виконання здобувачем всіх поставлених задач з використанням широкого спектру сучасних методів дослідження (мікроскопічних, бактеріологічних, фізико-хімічних, біохімічних, імунологічних

та медико-статистичних). Дослідження проведені у повному обсязі, а результати оброблені з використанням адекватних статистичних методів. Наукові положення і висновки дисертаційної роботи Книш О. В. є аналітичним узагальненням, що впливає з отриманих результатів та їх статистичної обробки, логічним відображенням змісту та свідчать про її завершеність.

Аналіз наявності академічного плагіату та використання результатів раніше захищеної здобувачем кандидатської дисертації. За результатами рецензування матеріалів дисертаційної роботи «Теоретичне та експериментальне обґрунтування нового напрямку створення метабіотиків на основі дериватів *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*» не виявлено ознак наявності академічного плагіату і дублювання результатів, представлених у кандидатській дисертації Книш О. В. з теми: «Вплив факторів кріоконсервування на морфофункціональні властивості тромбоцитів людини» (Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – Харків, 2008).

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації. Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації базуються на достатній кількості *in vitro* та *in vivo* досліджень. В експериментах було використано 7 штамів пробіотичних та 18 штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, досліджено біологічні властивості 7 видів безклітинних екстрактів та 14 видів безклітинних супернатантів. Токсикологічний скринінг, дослідження імуотропних властивостей та здатності здійснювати протиінфекційний захист *in vivo* проведені із залученням тварин та з використанням периферичної крові донорів-добровольців у кількості, достатній для отримання достовірних даних. Всі етапи роботи добре сплановані, експерименти проведені на високому науковому і методичному рівні. Сформульовані дисертантом висновки логічно впливають з отриманих результатів. Практичні рекомендації чітко окреслюють напрямки

застосування екстрактів як лікувально-профілактичних засобів в практичній медицині після проведення необхідних клінічних досліджень.

Достовірність і наукова новизна наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації. Дисертантом вперше теоретично обґрунтована та експериментально доведена ефективність нового підходу до отримання структурних компонентів та продуктів метаболізму бактерій пробіотичних штамів. Дезінтеграти, отримані термоциклюванням суспензій пробіотичних бактерій, вперше застосовані як поживні середовища для отримання їх продуктів метаболізму. Безклітинні екстракти одержані без використання поживних середовищ, за рахунок чого кінцевий продукт не містить компонентів поживних середовищ. Відсутність сторонніх домішок у кінцевому продукті підвищило його безпечність. Встановлено, що отримані новим способом безклітинні екстракти не мають токсичного впливу як за одноразового, так і за повторних введень за умови строгого застосування у дозі, що відповідає терапевтичній дозі клітинних пробіотиків. Показана здатність безклітинних екстрактів дозозалежно впливати на метаболічну активність еукаріотичних клітин. Надана порівняльна характеристика біохімічного складу та антиоксидантних властивостей безклітинних екстрактів з дезінтегратів та культур пробіотичних бактерій. В дисертаційній роботі підтверджена перспективність застосування пробіотичних бактерій як систем біохімічної модифікації для пошуку нових протимікробних речовин. Вперше виявлено ефект потенціювання аскорбіновою кислотою інгібіторних властивостей безклітинних екстрактів щодо патобіонтів, зокрема, антибіотикорезистентних ізолятів. Продемонстровано значний стимуляторний вплив безклітинних екстрактів на адгезивну здатність, проліферативну активність та біоплівкоутворення пробіотичних бактерій. В експериментах *in vitro* та *in vivo* виявлено значну імуномодуляторну активність та здатність безклітинних екстрактів, отриманих при культивуванні пробіотичних бактерій у власних дезінтегратах з додаванням аскорбінової кислоти, здійснювати протиінфекційний

захист та корегувати мікроекологічні порушення при моделюванні інфекційного процесу на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу. Наведені в дисертаційній роботі методи статистичної обробки даних дозволяють оцінити основні наукові положення і висновки автора як достовірні.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблені та захищені патентами способи одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів, протимікробної композиції на основі безклітинного екстракту з культури *Lactobacillus reuteri* та протимікробного екстракту з культури *Lactobacillus reuteri* (патенти України № 122859; № 139022 і № 139023). Вони є основою нового підходу до створення метабіотиків, що містять деривати бактерій пробіотичних штамів *Bifidobacterium bifidum* 1 та *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 з високою біорегуляторною активністю. Розроблена технологія одержання протимікробного екстракту з культури *Lactobacillus reuteri* дозволяє значно підвищити протимікробну активність безклітинного екстракту з пробіотичного штаму *L. reuteri*. Застосування такого екстракту може сприяти підвищенню ефективності лікування інфекційно-запальних захворювань, зокрема, спричинених антибіотикорезистентними штамми. Здатність БКЕ здійснювати протиінфекційний захист та корегувати мікроекологічні порушення при моделюванні інфекційного процесу на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу у тварин обґрунтовують необхідність проведення подальших клінічних досліджень ефективності введення безклітинних екстрактів у протоколи лікування дисбіозів. Основні положення дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес і наукову роботу кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету, наукову роботу відділу кріомікробіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України та акціонерного товариства «Біолік».

Повнота викладу матеріалу дисертації в опублікованих роботах і авторефераті. Основні наукові положення, висновки та отримані результати

повною мірою висвітлені у 35 наукових працях, з яких 21 стаття у наукових фахових виданнях (2 публікації у виданні, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus (Q3); 11 публікацій у виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Web of Science; 1 публікація у зарубіжному та 7 публікацій у вітчизняних фахових виданнях, включених до інших міжнародних наукометричних баз, 10 тез у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій, 3 патенти України на корисну модель, 1 галузеве нововведення у сфері охорони здоров'я. Основні наукові положення та висновки дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на науково-практичних конференціях різного рівня. Автореферат повністю відповідає змістові дисертації, розкриває наукову цінність та практичну значущість дисертації.

Відповідність оформлення дисертації вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 зі змінами та наказу Міністерства освіти і науки від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій». Дисертаційна робота Книш О. В. «Теоретичне та експериментальне обґрунтування нового напрямку створення метабіотиків на основі дериватів *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*» викладена на Дисертаційна робота викладена на 386 сторінках друкованого тексту, містить вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, шість розділів власних досліджень з аналізом та узагальненням їх результатів, висновки, практичні рекомендації та список використаних першоджерел (480 посилань). Дисертаційна робота ілюстрована 21 таблицею і 71 рисунком та містить 5 додатків.

У вступі автором сформульовано актуальність та обґрунтовано доцільність проведення досліджень в обраному науковому напрямку. Зазначено зв'язок дисертаційного дослідження з науковими програмами, планами і темами Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова

Національної академії медичних наук України». Докладно розкрито наукову новизну і практичне значення роботи.

В огляді літератури висвітлені сучасні погляди на роль представників родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* у забезпеченні протиінфекційного захисту, протизапальних ефектів та визначального впливу на розвиток і формування імунної системи людини. Вказані недоліки і можливі негативні наслідки клітинної пробіотикотерапії та обґрунтовано необхідність розробки препаратів нового покоління дериватного типу. Представлено огляд постбіотичних засобів, присутніх на фармацевтичному ринку, способів отримання та біологічних властивостей похідних пробіотичних бактерій. Обґрунтовано перспективність використання пробіотичних бактерій як систем біохімічної модифікації. Ретельний аналіз даних літератури дав змогу Книш О. В. сформулювати свою концепцію створення пробіотичних препаратів, право на існування якої було підтверджено в ході вирішення поставлених задач.

Розділ 3. «Розроблення нового способу одержання біологічно активних дериватів пробіотичних бактерій». Розроблено новий спосіб одержання біологічно активних структурних компонентів та метаболітів бактерій пробіотичних штамів *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*, що ґрунтується на застосуванні дезінтеграції бактеріальних клітин термоциклюванням з подальшим культивуванням бактерій-продуцентів метаболітів у власних дезінтегратах. Визначено найбільш оптимальний спосіб дезінтеграції: десятиразове термоциклювання шляхом повільного заморожування суспензії клітин до $(-23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ з наступним відігріванням при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Розділ 4. Токсикологічний скринінг безклітинних екстрактів. Проведено токсикологічний скринінг одержаних розробленим способом безклітинних екстрактів і показано, що вони здатні впливати на метаболічну активність еукаріотичних клітин концентрацією-залежним чином та не виявляють токсичного впливу *in vivo* за умови введення тваринам у дозі, що відповідає добовій

терапевтичній дозі клітинних пробіотиків. Встановлено відсутність місцево-подразнюючої дії дослідних екстрактів.

Розділ 5. Біохімічні властивості безклітинних екстрактів. Дисертант представила результати дослідження біохімічного складу та антиоксидантних властивостей безклітинних екстрактів. У складі екстрактів виявлено компоненти з потенційною протимікробною, імунотропною та протизапальною активністю. Встановлено, що екстракти з культур пробіотичних бактерій, вирощених у власних дезінтегратах, характеризуються нижчими показниками рН, вищим вмістом молочної кислоти та білку, ніж екстракти з дезінтегратів. Показано, що 95 – 97 % білкового компоненту екстрактів складають пептиди з молекулярною масою менше 12 кДа. Заслужують на увагу результати дослідження антиоксидантних властивостей екстрактів, які показали, що екстракт з дезінтеграту лактобактерій володіє антиокислювальною активністю на рівні відомого антиоксиданту α -токоферолу, та всі екстракти здатні ефективно перехоплювати найбільш реакційно здатні гідроксильні радикали.

Розділ 6. Вплив безклітинних екстрактів на фізіологічні властивості патобіонтів та патогенів. Автор подала докладний опис результатів вивчення впливу екстрактів на адгезивні властивості, проліферативну активність та біоплівкоутворення патогенів та патобіонтів. На першому етапі досліджень було виявлено, що екстракти з дезінтегратів і культур пробіотичних бактерій, отриманих при культивуванні у власних дезінтегратах, характеризуються низькою і помірною вибірковою інгібіторною активністю щодо патобіонтів. Лише екстракт з культури лактобактерій, вирощеної у дезінтеграті з додаванням гліцерину та глюкози, виявив високу інгібіторну активність. Це спонукало автора до проведення скринінгового дослідження з метою відбору серед потенційних речовин-попередників, схожих за хімічною структурою до гліцерину, таких, що мають здатність підвищувати інгібіторний потенціал постбіотичних продуктів. При цьому пробіотичним бактеріям відводилася роль систем біохімічної

модифікації. Було встановлено, що подібна до гліцерину дія притаманна аскорбіновій кислоті. Виявлені ефекти підвищення протимікробної активності екстрактів при застосуванні гліцерину з глюкозою та аскорбінової кислоти стали основою розроблених і запатентованих способів одержання протимікробного екстракту та протимікробної композиції на основі безклітинного екстракту з культури *Lactobacillus reuteri*. Важливе практичне значення мають результати дослідження, що демонструють високий інгібіторний потенціал зазначених екстрактів щодо антибіотикорезистентних клінічних ізолятів.

Розділ 7. Вплив безклітинних екстрактів на фізіологічні властивості пробіотичних бактерій. Отримані в межах цього розділу роботи експериментальні дані мають важливе значення як для практичної медицини, так і для розвитку біотехнології. Виявлені в експериментах *in vitro* лакто- і біфідогенний ефекти екстрактів свідчать про доцільність їх спільного використання з пробіотичними бактеріями для підвищення приживлення останніх в шлунково-кишковому тракті, а також про можливість застосування екстрактів як засобів підвищення економічної ефективності виробництва пробіотичних культур шляхом збільшення загальної продуктивності біомаси клітин.

Розділ 8. Імунотропні властивості та ефективність застосування безклітинних екстрактів *in vivo*. Продемонстровані в експериментах *in vitro* та *in vivo* імунотропна активність безклітинних екстрактів, їх здатність здійснювати протиінфекційний захист та корегувати мікроекологічні порушення при експериментальному моделюванні інфекційного процесу на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу. Патогенетично обґрунтоване застосування екстрактів як імуномодуляторів в комплексній терапії інфекційних захворювань, засобів неспецифічної профілактики рецидивів і зниження ризику хронізації інфекційного процесу, а також як метабіотиків при корекції дисбіозів.

Кожен із шести розділів власних досліджень містить аналіз та узагальненням результатів дослідження, їх порівняння з даними, отриманими

іншими дослідниками. Автор також обґрунтовує і пояснює виявлені ефекти, або робить припущення про причини та механізми, що лежать в їх основі, демонструючи вміння аналізувати матеріал. Кожен розділ закінчується висновками і посиланнями на роботи, в яких висвітлені одержані результати дослідження.

Висновки логічно випливають з матеріалів дисертації, повною мірою відображають зміст і результати роботи.

В цілому робота заслуговує на позитивну оцінку, але в процесі ознайомлення з нею виникли деякі зауваження:

1. Розділ «Матеріали і методи»: загальновідомі методи не потребують докладного опису, достатньо надати посилання на них. Більш цікавим буде пояснення: для чого був застосований метод і які результати буде отримано за його використання.

2. Текст дисертації містить велику кількість абревіатур, що значно ускладнює сприйняття матеріалу.

Вказані зауваження не впливають на якість та повноту викладених матеріалів.

З метою уточнення окремих положень дисертаційної роботи виникла необхідність отримати відповіді на наступні питання:

1. Що стало передумовою для застосування дезінтегратів як середовищ культивування?

2. Чим можна пояснити той факт, що серед досліджених безклітинних екстрактів найвищу здатність пригнічувати проліферативну активність індикаторних бактерій виявив екстракт з культур лактобактерій?

3. Чим можна пояснити різноспрямований вплив безклітинних екстрактів з дезінтегратів (В і L) та культур пробіотичних бактерій, отриманих при культивуванні у власних дезінтегратах (МВ і ML), на проліферативну активність індикаторних грампозитивних бактерій?

4. Чим зумовлене значне підвищення здатності пробіотичних бактерій до біоплівкоутворення після одноразового заморожування-відтавання і зниження здатності до біоплівкоутворення після п'яти- та десятиразового термоциклювання?

Відповідність напрямку досліджень і змісту дисертації галузі науки, формулі спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради.

Напрямок і зміст дисертаційної роботи «Теоретичне та експериментальне обґрунтування нового напрямку створення метабіотиків на основі дериватів *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*» повністю відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (ДУ «ІМІ НАМН») та спеціальності 03.00.07 – мікробіологія.

Висновок

Дисертаційна робота Книш Оксани Василівни «Теоретичне та експериментальне обґрунтування нового напрямку створення метабіотиків на основі дериватів *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*» є самостійним, завершеним науковим дослідженням з актуальної теми, відзначається науковою новизною і практичною значущістю, викладена діловою мовою з логічною послідовністю, містить кваліфікований аналіз та інтерпретацію результатів власних досліджень, що в сукупності вирішують наукову проблему недостатньої ефективності та безпечності клітинної пробіотикотерапії шляхом розроблення нового напрямку створення метабіотиків з високою біорегуляторною активністю, що не містять сторонніх потенційно шкідливих домішок.

Дисертація за актуальністю, об'ємом і методичним рівнем проведених досліджень, науковою новизною і практичною значущістю отриманих результатів відповідає вимогам пунктів 9, 10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. зі змінами і Наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про

затвердження вимог до оформлення дисертації», які висуваються до докторських дисертацій, а її автор Книш О. В. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук зі спеціальності 03.00.07 – мікробіологія.

Професор кафедри клінічної імунології

та мікробіології ХМАПО

доктор медичних наук, професор



Брюкова С. В.