

Відгук

офіційного опонента

професора кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», доктора медичних наук, професора Кременчуцького Геннадія Миколайовича 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 обраної теми. Найбільш поширеними засобами відновлення нормального складу мікробіоценозів є препарати, що містять живі або ліофілізовані пробіотичні бактерії та пребіотики. Основними корисними ефектами застосування пробіотичних штамів є утворення антибактеріальних речовин, конкуренція з потенційними патогенами за поживні речовини та сайти адгезії, зміна мікробного метаболізму (ферментативної активності), імуномодуляторна, протизапальна, протиракова та протихолестеринемічна дія. Але протягом останнього часу накопичився достатньо вагомий обсяг даних, які свідчать про недостатню ефективність клітинних пробіотиків через зниження їх кількості і активності під час транзиту через шлунково-кишковий тракт та здатність спричиняти цілу низку негативних наслідків або небажаних побічних ефектів: алергічні, автоімунні реакції, опортуністичні інфекції (ендокардити, сепсис, бактеріємії, пневмонії, кишкові абсцеси, менінгіти, урологічні інфекції), посилення агрегації тромбоцитів тощо. Тому їхній статус як абсолютно безпечних для здоров'я людини лікувальних засобів був поставлений під сумнів, а їхня клінічна ефективність вважається недостатньо доведеною. Пребіотики теж не здатні повністю вирішити проблему порушень мікробіоценозу.

Відомо, що ключову роль у міжмікробних взаємодіях та взаємодіях між макроорганізмом та симбіонтною мікрофлорою відіграють похідні бактерій – структурні компоненти, продукти метаболізму та сигнальні молекули. Тому з метою впливу на мікробом та цілу низку функцій макроорганізму було запропоновано застосовувати саме їх. Пробіотичні похідні не здатні викликати опортуністичні інфекції, не потребують часу для приживлення і активації в шлунково-кишковому тракті та мають цілу низку додаткових переваг порівняно з клітинними пробіотиками. Найвідомішим засобом цього класу, який впродовж майже двох десятиліть залишається безальтернативним препаратом на фармацевтичному ринку України, є метабіотик Хілак форте («Ratiopharm GmbH», Німеччина). На сьогоднішній день відомі й інші метабіотики закордонного виробництва, але вони не є доступними в аптечній мережі. Дотепер в Україні відсутні вітчизняні засоби постбіотичного ряду та їх промислове виробництво. З огляду на це, доцільність виконання дисертаційної роботи Книш О. В., її актуальність, теоретична та практична значущість для розвитку сучасної медичної науки, зокрема вітчизняної, не викликають сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у лабораторії профілактики краплинних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (ДУ ІМІ НАМН) впродовж 2016-2020 рр., в межах планових науково-дослідних робіт: «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів» (№ державної реєстрації 0116U000864) та «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто- та біфідо- пробіотиків», (№ державної реєстрації 0119U100686).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Автор достатньо коректно обґрунтувала наукові положення, висновки і

рекомендації. Обґрунтованість наукових положень, сформульованих здобувачем, забезпечена достовірними даними достатньої кількості експериментів і узгодженими з ними науковими висновками. Достовірність експериментальних даних забезпечена релевантним використанням автором як класичних, так і сучасних засобів і методик проведення досліджень, які мають незаперечні переваги перед традиційними, а також доречним застосуванням методів статистичної обробки отриманих даних. Висновки логічно випливають з одержаних експериментальних даних, проаналізованих і порівняних з даними попередніх досліджень інших авторів, та відповідають поставленим у вступі меті і завданням дисертаційного дослідження. Практичні рекомендації обґрунтовані, базуються на достовірних даних експериментальних досліджень і визначають де і з якою метою можуть бути застосовані розроблені способи одержання пробіотичних похідних та отримані постбіотичні продукти.

Наукова новизна результатів дослідження. Результати, отримані автором, в цілому є новими науковими знаннями, які формують новий напрямок досліджень. Насамперед заслуговує на увагу обґрунтований автором новий підхід до отримання дериватів пробіотичних бактерій, який полягає у дезінтеграції клітин шляхом термоциклювання та культивуванні пробіотичних клітин у дезінтегратах власних клітин, а також забезпечує присутність у кінцевому продукті як структурних компонентів, так і продуктів метаболізму пробіотичних бактерій. При дослідженні цитотоксичності *in vitro* виявлено здатність безклітинних екстрактів концентраціє-залежним чином впливати на метаболічну активність еукаріотичних клітин. Дослідженнями *in vivo* встановлено відсутність токсичності безклітинних екстрактів при одноразовому і повторних введеннях у дозі, що відповідає добовій терапевтичній дозі клітинних пробіотиків та можливість їх тривалого перорального застосування за умови строгого дозування. Виявлені відмінності за вмістом біологічно активних компонентів та антиоксидантними властивостями між екстрактами з

дезінтегратів та екстрактами з культур пробіотичних бактерій. Вперше виявлено ефект потенціювання аскорбіновою кислотою інгібіторної активності безклітинних супернатантів та екстрактів щодо патобіонтів. Вперше встановлена висока інгібіторна активність екстрактів з культур біфідо- і лактобактерій, що вирощувалися у власних дезінтегратах з додаванням аскорбінової кислоти, по відношенню до антибіотикорезистентних клінічних ізолятів. Виявлена здатність більшості екстрактів одночасно підвищувати адгезивні властивості, проліферацію та біоплівкоутворення пробіотичних бактерій *in vitro* значно поглиблює знання про стимуляторні властивості дериватів пробіотиків. Вперше показана імунomodulatory та протективна активність безклітинних екстрактів за умов бактеріального впливу *in vitro* та *in vivo*.

Повнота викладу результатів дослідження в опублікованих працях та авторефераті. За темою дисертації опубліковано 35 наукових праць: 21 стаття у наукових фахових виданнях, 10 тез у збірниках конференцій та форумів, 3 патенти України на корисну модель та 1 галузеве нововведення у сфері охорони здоров'я. Основні наукові результати дисертаційного дослідження повністю викладені у 13 статтях, включених до міжнародних наукометричних баз Scopus (Q3) (2 публікації) та Web of Science (11 публікацій, серед яких 2 – одноосібно), 1 стаття у зарубіжному та 7 статей у вітчизняних фахових виданнях, включених до інших міжнародних наукометричних баз. Автореферат дисертації оформлений із дотриманням відповідних діючих вимог, містить матеріали, ідентичні матеріалам дисертації, відображає всі етапи дослідження і дає повне уявлення про суть роботи. Отже, результати дисертаційного дослідження Книш О. В. повністю відображені в опублікованих працях та авторефераті.

Практичне значення результатів дослідження. Основні матеріали і положення дисертаційної роботи впроваджено в наукову роботу відділу кріомікробіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, навчальний процес і наукову роботу кафедри мікробіології,

вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету МОЗ України та АТ «Біолік». Розроблені і запатентовані оригінальні способи отримання пробіотичних похідних можуть бути впроваджені біотехнологічними підприємствами для застосування при промисловому виробництві постбіотичних продуктів. Безклітинні екстракти з високою інгібіторною щодо патобіонтів, стимуляторною щодо пробіотичних бактерій, протизапальною та імуномодуляторною активністю після проведення клінічних досліджень автор рекомендує включити у протоколи лікування дисбіозів та інфекційно-запальних захворювань, зокрема, спричинених антибіотикорезистентними штамми, що може значно підвищити ефективність їх лікування.

Оформлення та зміст дисертації. Дисертаційна робота Книш О. В. оформлена згідно «Вимог до оформлення дисертації», затверджених Наказом МОН України 12.01.2017 № 40. Написана державною мовою з використанням фахової термінології і має всі необхідні структурні елементи: 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. Містить 21 таблицю, 71 рисунок і 5 додатків. Обсяг основного тексту дисертації становить 386 сторінок.

Вступ дозволяє сформулювати загальне уявлення про дисертаційну роботу, містить логічне обґрунтування вибору теми дослідження із зазначенням її зв'язку з плановими науково-дослідними роботами лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН», чітко і коректно сформульовані мету і завдання та вірно визначені предмет і об'єкт дослідження, стислий, але змістовний перелік використаних методів дослідження, коротко представлені отримані нові наукові дані. У вступі зазначена практична значущість результатів дисертаційного дослідження, конкретизований особистий внесок здобувача, перелічені конференції і форуми національного та міжнародного рівнів з місцем та датами

проведення, на яких було оприлюднено результати дисертаційної роботи, публікації та містяться дані про обсяг і структуру дисертації.

Розділ 1. «Огляд літератури». Автор провела критичний аналіз достатньо великого обсягу нової інформації стосовно наукової проблеми, вирішенню якої присвячена дисертаційна робота. Аналітичний огляд літературних даних дозволив автору обґрунтувати актуальність, визначити мету та завдання дисертаційної роботи. Огляд написаний логічно, не перевищує 20 % обсягу основної частини дисертації, описує сучасний стан і проблеми пробіотичної терапії, визначає передумови та перспективи створення нових засобів дериватного типу. Огляд літератури складається з шести підрозділів. В першому підрозділі докладно охарактеризована роль окремих представників мікрофлори тіла людини в забезпеченні нормобіозу та розвитку дисбіозу. Другий підрозділ присвячений висвітленню проблем, недоліків і негативних наслідків клітинної пробіотикотерапії та окреслені шляхи їх вирішення. У третьому та четвертому підрозділах надана характеристика біологічної ролі пробіотичних похідних, способи їх одержання та склад відомих сучасних метабіотиків закордонного виробництва. У п'ятому та шостому підрозділах намічені перспективні стратегічні підходи до розроблення нових постбіотичних засобів і принципи дослідження токсичності та безпечності новостворених біотехнологічних продуктів.

Розділ 2. «Матеріали і методи досліджень» являє собою розгорнутий опис застосованих методичних підходів і методів дослідження. Заслуговує на позитивну оцінку обрання автором широкого спектру дослідницьких методик: від простих, класичних до складних, сучасних, що забезпечує вивчення явищ і процесів на різних рівнях та свідчить про високий науково-методичний рівень дисертаційного дослідження. Автор застосовує також сучасні методи статистичного аналізу за допомогою програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA) або Excel 2003, 2010 (Microsoft, США).

Розділ 3. «Розроблення нового способу одержання біологічно активних дериватів пробіотичних бактерій» описує етапи розроблення та результати дослідження впливу гіпотермічного зберігання, одноразового та повторних циклів заморожування-відтавання на життєздатність і морфо-функціональні властивості пробіотичних клітин *Bifidobacterium bifidum* 1 та *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Висновок автора про те, що гіпотермія та заморожування-відтавання сприяють переходу бактерій від планктонної до біоплівкової форми існування ґрунтується на отриманих в даному блоці досліджень результатах: зазначені умови призводили до пригнічення проліферативної активності бактерій і підвищення їх здатності до біоплівкоутворення. Кількість життєздатних пробіотичних бактерій після десятиразового заморожування-відтавання (термоциклювання) за найбільш несприятливим для збереження морфо-функціональної цілісності клітин режимом, який серед досліджених забезпечував найвищий ступінь дезінтеграції, становить біля 35 %. Але клітини, що залишилися живими, зберігають достатньо високу здатність до проліферації та біоплівкоутворення. Автор зробила припущення про можливість використання суспензій дезінтегрованих клітин як середовищ для культивування пробіотичних бактерій з метою отримання їх продуктів метаболізму, а згодом експериментально підтвердила його вірність.

Розділ 4. «Токсикологічний скринінг безклітинних екстрактів» складається з двох підрозділів, один з яких присвячений вивченню цитотоксичності екстрактів *in vitro* з використанням МТТ- та Alamar-blue тестів, а другий містить результати дослідження токсичності екстрактів *in vivo* із застосуванням тестів і принципів, що рекомендовані міжнародними регуляторними настановами і методичними рекомендаціями. Екстракти вводили мишам двома шляхами в двох дозах (терапевтична і максимальна). Досліджено: гостру токсичність (при одноразовому введенні), токсичність при повторних введеннях та місцеву толерантність. Результати експериментів *in vitro* продемонстрували здатність безклітинних екстрактів

впливати на відновлювальну активність еукаріотичних клітин, а результати експериментів *in vivo* – нетоксичність екстрактів і можливість їх тривалого перорального застосування за умови строгого дозування та відсутність у них місцево-подразнюючої дії.

Розділ 5. «Біохімічні властивості безклітинних екстрактів» присвячений дослідженню вмісту в них потенційних біологічно активних компонентів та антиоксидантних властивостей екстрактів: прямої антиокислювальної активності та здатності до перехоплення ОН-радикалів. В екстрактах виявлені компоненти, що мають потенційну протимікробну, протизапальну, імуномодуляторну та інші види біологічної активності. Причому, вміст біологічно активних компонентів в екстрактах з дезінтегратів і культур відрізнявся. Це стало обґрунтуванням різної активності екстрактів на наступних етапах дослідження. Важливими результатами дослідження стали виявлення прямої антиокислювальної активності екстракту з дезінтеграту лактобактерій та здатності всіх екстрактів в тій чи іншій мірі до перехоплення найбільш реакційно спроможного ОН-радикалу.

Розділ 6. «Вплив безклітинних екстрактів на фізіологічні властивості патобіонтів та патогенів» найбільший за обсягом та кількістю підрозділів. Дослідження цього етапу були спрямовані на визначення протимікробних властивостей екстрактів за їх здатністю впливати на адгезію, проліферацію і біоплівкоутворення патобіонтів. Результати досліджень показали здатність екстрактів до зниження адгезивної властивості патобіонтів не більше, ніж на 20%, проте цього було достатньо для можливості переведення культури *S. aureus* з «високоадгезивної» до «середньоадгезивної», а культури *E. coli* – з «середньо-» до «низькоадгезивної» категорії. Екстракти продемонстрували різну здатність впливати на проліферацію і біоплівкоутворення патобіонтів. Найвища інгібіторна активність щодо патобіонтів, зокрема, антибіотикорезистентних клінічних ізолятів, була виявлена у екстрактів із культур за умови додавання до дезінтеграту, як середовища культивування пробіотичних бактерій,

гліцерину з глюкозою або аскорбінової кислоти. Окремим дослідженням в загальному контексті виконаного етапу став скринінг потенційних речовин-попередників: сорбіту, ксиліту, маніту, фруктози та екстракту стевії як додаткових компонентів дезінтегратів і виявлення різноспрямованого ефекту від їх додавання до складу дезінтегратів. Важливе практичне значення мають результати дослідження впливу екстрактів на біоплівкоутворення патобіонтів. Екстракти з культур пробіотичних бактерій, вирощених у власних дезінтегратах, володіють вищий протибіоплівковий потенціал, ніж екстракти з дезінтегратів. Екстракти, отримані шляхом культивування *B. bifidum* 1 і *L. reuteri* DSM 17938 у власних дезінтегратах з додаванням гліцерину та глюкози або аскорбінової кислоти, значно пригнічують біоплівкоутворення всіх індикаторних культур патобіонтів (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*). Отримані результати обґрунтовують доцільність застосування екстрактів з високою щодо патобіонтів інгібіторною активністю для підвищення ефективності лікування бактеріальних інфекцій, зокрема, спричинених стійкими до антибіотиків штамми.

Розділ 7. «Вплив безклітинних екстрактів на фізіологічні властивості пробіотичних бактерій» складається з трьох підрозділів і яскраво демонструє стимуляторні властивості більшості екстрактів щодо активності пробіотичних бактерій: адгезивної, проліферативної та біоплівкоутворення. Виявлені стимуляторні властивості обґрунтовують доцільність застосування екстрактів принаймні в двох напрямках – при виробництві пробіотичних бактерій з низькою продуктивністю накопичення біомаси для її збільшення та для підвищення приживлення пробіотиків при спільному введенні екстрактів з ними.

Розділ 8. «Імунотропні властивості та ефективність застосування безклітинних екстрактів *in vivo*» виступає фінальним і чи не найяскравішим акордом дисертаційного дослідження, який відзначається вдалим дизайном експериментів та містить цікаві і подекуди неочікувані результати.

Складається з трьох підрозділів: вивчення імунотропних властивостей безклітинних екстрактів *in vitro*, *in vivo* та їх здатності здійснювати протиінфекційний захист *in vivo* при моделюванні інфекційного процесу у мишей на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу. Результати експериментів даного розділу обґрунтовують доцільність застосування екстрактів як засобів з протизапальною, протимікробною та імуномодуляторною активністю при дисбіотичних станах, інфекційних процесах та їх поєднанні.

Результати власних досліджень, представлені в основній частині дисертації, в повній мірі розкривають визначені у вступі мету та завдання роботи. Усі розділи автор логічно завершує висновками, які допомагають кращому сприйняттю значного обсягу отриманих результатів.

Висновки дисертаційної роботи повністю обґрунтовані, логічні і відповідають меті та завданням дослідження.

Практичні рекомендації. Автор дисертації надала рекомендації щодо практичного використання результатів досліджень, а саме: запропоновувала для впровадження на біотехнологічних підприємствах України технологію одержання протимікробного екстракту з культури *L. reuteri* DSM 17938, який після проведення клінічних досліджень може застосовуватися як етіопатогенетичний засіб при лікуванні дисбіозів та запальних захворювань інфекційної етіології, зокрема, спричинених антибіотикорезистентними штамми бактерій.

Список використаних джерел сформований у порядку появи посилань у тексті, оформлений згідно з ДСТУ 8302:2015 «Інформація та документація. Бібліографічне посилання. Загальні положення та правила складання», складається з 480 першоджерел: 384 латиницею та 96 кирилицею.

Додатків 5, серед яких «Список публікацій за темою дисертації», «Відомості про апробацію результатів дисертації», копії патентів, реєстраційна картка технології, 3 акти впровадження та диплом-відзнака Президії Національної академії медичних наук України науково-дослідної

роботи «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів» (№ державної реєстрації 0116U000864) як кращої, що була виконана у 2018 році.

Зауваження, пропозиції та запитання до змісту дисертації:

1. Чи застосовували ви ультразвукову дезінтеграцію клітин? Які, на ваш погляд, переваги дезінтеграції клітин методом термоциклювання?
2. Який, на вашу думку, механізм модифікації адгезії пробіотичних бактерій (*B. bifidum* і *L. reuteri*) і патобіонтів (*E. coli* і *S. aureus*) за впливу екстрактів з дезінтегратів і культур *B. bifidum* 1 і *L. reuteri* DSM 17938? Які компоненти у складі екстрактів відповідальні за підвищення адгезивного потенціалу біфідобактерій і лактобактерій та зниження адгезивного потенціалу патобіонтів? Які можливі наслідки переходу патобіонтів *S. aureus* та *E. coli* в категорії з нижчим адгезивним потенціалом?
3. Судячи з ваших даних, дезінтеграти біфідо- і лактобактерій не містили інгібітори росту власних клітин. А як пояснити їх інгібіторний вплив на інші культури біфідо-, лактобактерій і патобіонтів? З'ясування природи інгібіторного ефекту безклітинного екстракту, одержаного шляхом культивування пробіотиків в дезінтегратах з додаванням аскорбінової кислоти, показало, що найбільший внесок належав кислим продуктам метаболізму. А що можна сказати у відношенні пептидів, які могли бути мікроцинами?
4. Очевидно, значний інгібіторний ефект безклітинного супернатанта культури біфідобактерій, що культивувалася у власному дезінтеграті з додавання аскорбінової кислоти, був зумовлений синергетичною дією аскорбінової кислоти та інгібіторних сполук, продукованих *B. bifidum* у процесі культивування. На вашу думку, з якими саме інгібіторними продуктами виявляє синергетичну дію аскорбінова кислота?

5. Найбільш вираженою здатністю пригнічувати біоплівкоутворення володіли безклітинні екстракти з культур пробіотиків, що культивувалися в дезінтегратах з додаванням гліцерину з глюкозою або аскорбінової кислоти. Але ці ж екстракти демонстрували стимуляторний вплив на біоплівкоутворення пробіотичних бактерій. Який, на вашу думку, механізм диференційованого впливу на біоплівкоутворення?

Відповідність напряму досліджень і змісту дисертації галузі науки, формулі спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради. Напрямок проведених досліджень і зміст дисертації Книш О. В. відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 та спеціальності 03.00.07 – мікробіологія.

Висновок

Докторська дисертація Книш Оксани Василівни «Теоретичне та експериментальне обґрунтування нового напрямку створення метабіотиків на основі дериватів *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*» є самостійною, завершеною, виконаною на високому методичному рівні науковою працею, яка містить науково обґрунтовані результати, присвячена розв'язанню важливої науково-прикладної проблеми медицини – недостатньої ефективності та безпечності традиційної пробіотичної терапії клітинними препаратами шляхом розробки нових підходів до створення безпечних метабіотиків на основі дериватів пробіотичних бактерій, що володіють високою інгібіторною щодо патобіонтів, стимуляторною щодо пробіотичних бактерій, імуномодуляторною, протективною активністю та не містять компонентів поживних середовищ.

На підставі проведеного аналізу можна зробити висновок, що дисертаційна робота за своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, науковою новизною, теоретичною та практичною значущістю отриманих результатів, обґрунтованістю основних положень та висновків відповідає вимогам «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 мікробіології,
вірусології, імунології та епідеміології
ДУ "Дніпровська державна
медична академія МОЗ України",
доктор медичних наук. професор

Г. М. Кременчуцький
Кременчуцький Г.М.

