

В І Д Г У К

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Мелешко Т.В.**

«Кишкова мікробіота за поширених некомунікативних захворювань людини та її персоналізована корекція при лікуванні пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу»,

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, 091 – біологія

Актуальність дисертаційної роботи.

Мікробіота кишечника є однією з найбільш динамічних та представлена найширшим спектром видів мікроорганізмів серед усіх біотопів організму людини. Вона відіграє дуже велику роль у реалізації багатьох процесів у нашому організмі, що реалізується через різноманітні взаємодії з фізіологічними системами людини. Відомий вплив на травну, нервову, ендокринну та інші системи зі здійсненням як позитивного, так і негативного впливу.

Станом на сьогодні доведено зв'язок мікробіоти з розвитком таких некомунікативних захворювань людини як атеросклероз, ожиріння, цукровий діабет 2-го типу (ЦД-2) та серцево-судинні захворювання. Ці патологічні стани вельми поширені у сучасному суспільстві і часто асоціюються з порушеннями харчування, що має безпосередній вплив на бактерії шлунково-кишкового тракту.

У цьому сенсі коригування складу мікробіоти може стати дієвим заходом профілактики некомунікативних захворювань, однак, при цьому має бути враховано унікальність складу мікроорганізмів у кожної людини та необхідність створення персоналізованих програм функціонального харчування.

Оптимальним підходом для досягнення цієї мети є персоналізоване дослідження мікробіоти людини для визначення прогностичних маркерів некомунікативних захворювань та розробка комплексного про-/пребіотичного індивідуального препарату з урахуванням ефективності взаємодій його компонентів з «небажаними» учасниками мікробіоти. Однак, це потребує значних витрат часу та має досить високу вартість, тому значущим є підхід з

використанням ІТ-систем, що може прискорити та значно здешевити аналіз.

Зважаючи на це робота Мелешко Т.В. є актуальною та дозволяє відкрити нові перспективи у розв'язанні питань оздоровлення людини шляхом використання безпечних засобів, які поєднують натуральні компоненти та досягнення аналітичних технологій.

Дисертаційні дослідження виконані в рамках науково-дослідних тем Науково-дослідницького та навчального Центру молекулярної мікробіології та імунології слизових оболонок» ДВНЗ «Ужгородський національний університет», а саме:

- держбюджетних тем – «Композиційна біологічна продукція з мікроорганізмів, рослин і наносполук» (номер державної реєстрації 0113U002369, 2013-2014 рр.); «Біологічні засоби дезінфекції і попередження формування біоплівки» (номер державної реєстрації 0115U001109, 2015-2016 рр.); «Впровадження нових підходів у створення та використання сучасних фармабіотиків» (номер державної реєстрації 0117U000379, 2017-2019 рр.);

- міжнародних проектів – «Європейська мережа для зниження бактеріальної колонізації, а також персистенції на їжі та обладнанні харчової промисловості», «VasFoodNet» (сьома рамкова програма, фінансувався Європейським Союзом, ідентифікаційний номер: COST Action FA1202, 2013-2016 рр.) і «Збір та внесення аналітичних даних складу продуктів харчування регіонів Європи і Центральної Азії» (фінансувався Продовольчою та сільськогосподарською організацією ООН (ФАО), 2017 р.).

Метою роботи було з'ясувати типові для поширених некомунікативних захворювань (НКЗ) індивідуальні співвідношення представників кишкової мікробіоти людини, спектрів біохімічних і імунних показників та реалізувати можливість експериментальної перевірки ідеї лікування НКЗ шляхом застосування коригуючих кишкову мікробіоту персоналізованих планів харчування.

Відповідно до мети було поставлено й розв'язано 5 завдань.

Об'єкт дослідження: особливості мікробіоти кишечника і ротової порожнини, пов'язані з НКЗ (атеросклерозом, ожирінням, ЦД-2 та ССЗ).

Предмет дослідження: показники мікробіоти кишечника і ротової порожнини в комплексі з біохімічними, імунологічними та фізикальними показниками пацієнтів з обраними НКЗ; персоніфіковані впливи на мікробіом для попередження та лікування цих захворювань.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше досліджено та виявлено типові для Закарпаття особливості співвідношень основних функціональних груп кишкової мікробіоти осіб з атеросклерозом, ожирінням, цукровим діабетом 2-го типу (ЦД-2) та серцево-судинними захворюваннями (ССЗ). Встановлено функціональні групи мікроорганізмів та співвідношення між ними за вказаних типів патологій. Відмічено збільшення кількості представників грамнегативних бактерій родів *Klebsiella*, *Proteus* та *Enterobacter*; імуномодулювальні властивості бактерій роду *Enterococcus* та коменсальних *Streptococcus* spp.; зниження кількості бактерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*, що продукують сполуки з нейроактивною дією; бактерій-бродильників та муциндеградувальних бактерій у пацієнтів з ожирінням.

При ЦД-2 найбільш характерним співвідношенням основних функціональних груп мікроорганізмів серед жителів Закарпаття було зменшення чисельності імуномодулювальних бактерій, лактатпродукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*, що продукують сполуки з нейроактивною дією, ацетат- та пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides* та інших.

Показано, що для осіб з ССЗ типове збільшення кількості імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus* spp., коменсалів родів *Streptococcus* та *Staphylococcus*, ЛПС-вмісних бактерій родів *Proteus* та *Enterobacter*, а також дріжджеподібних грибів роду *Candida*, поряд із зниженням присутності імуномодулювальних штамів, лактатпродукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*, що продукують сполуки з нейроактивною дією, бродильників та групи муциндеградувальних бактерій.

Вперше досліджено ефективність індивідуального підходу до харчування з використанням персонально підібраних пробіотичних та багатих на БАР компонентів рослинного походження, які спрямовано модулюють кишкову

мікробіоту в умовах діагностування ЦД-2, ССЗ, ожиріння.

Вперше визначено основні кореляційні залежності між зміною певних функціональних груп кишкової мікробіоти, показниками імунітету та біохімічними параметрами.

Вперше запропоновано впорядкований за значущістю показників перелік мікробних, біохімічних та імунних маркерів, що відповідає процедурі персоніфікованого лікування ЦД-2 шляхом корекції кишкової мікробіоти.

Практичне значення отриманих результатів.

Отримані результати щодо основних функціональних груп представників кишкової мікробіоти при атеросклерозі, ожирінні, ЦД-2 та ССЗ можуть знайти використання в якості нових комплексних маркерів вказаних захворювань, що вповні розкрито у дослідженнях з групою осіб хворих на ЦД-2. Запропонована схема маркерів дозволяє швидко визначитися у ризиках захворювання та оптимізувати схему харчування пацієнта на основі індивідуального підходу для досягнення максимального результату.

Також запропонована схема маркерів дозволяє реалізувати можливість практичного використання нового підходу до попередження і лікування НКЗ, який ґрунтується на коригуванні кишкової мікробіоти за допомогою персоніфікованого харчування із вживанням індивідуально сконструйованих пробіотиків та компонентів продуктів харчування рослинного походження, що мають пребіотичне призначення.

Розвинута і застосована у роботі методика пошуку і кількісного оцінювання якості мікробних, біохімічних та імунних маркерів процесу персоніфікованого лікування НКЗ шляхом корекції кишкової мікробіоти також має практичне використання, як складова нового методу здійснення – feature selection – оптимального відбору даних для машинного навчання, що може значно спростити, прискорити та здешевити процедуру персоніфікації добору мікроорганізмів та пребіотиків для корекції складу мікробіоти кожного конкретного пацієнта.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 197 сторінках і складається з розділів:

«Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», 5 розділів результатів власних досліджень, «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки», додатків та переліку посилань, що включає 328 джерел, з яких 284 – іноземних авторів. Робота містить 16 таблиць та 29 рисунків.

Публікації.

За матеріалами дисертації опубліковано 29 наукових робіт, серед них – 6 статей у вітчизняних фахових виданнях, 2 – у виданні включеному до міжнародної бази даних Scopus, 21 тези доповідей.

У **вступі** ґрунтовно розкрито актуальність теми дисертаційної роботи, показаний зв'язок експериментальної роботи з програмами наукових досліджень, наведено їх мету та завдання. Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів дозволяють характеризувати дослідження як нове та актуальне. Наводиться особистий внесок здобувача у виконання досліджень. Результати досліджень вповні представлені у наукових публікаціях, апробовані на наукових конференціях в Україні та за кордоном.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з 6 основних підпунктів, які всебічно розкривають поняття мікробіому організму людини у розрізі проблеми некомунікативних захворювань. Зокрема, розкривається участь мікробіоти у функціонуванні організму людини, її вплив на реалізацію функцій різних систем та наводяться дані, які дозволяють передбачати ефективність персоніфікованих підходів до корекції мікробіоти з метою оздоровлення осіб з НКЗ.

Аналіз світового наукового доробку дозволяє чітко визначитися з перспективними для досліджень питаннями і підтверджує коректність формулювання мети, вибору об'єкту та предмету досліджень.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» містить 7 основних підпунктів, в яких наведено деталізований опис дизайну досліджень. Подання методів та підходів, що використані для вирішення поставлених задач та досягнення мети, є раціональним та дозволяє оцінити комплексність підходів до вирішення проблеми. Методи адекватні поставленим задачам, є сучасними, репрезентативними, дозволяють отримати достовірні результати.

Характеристика розділу «Результати та їх обговорення»

У розділі 3 «Результати дослідження зміни кишкової мікробіоти за умов некомунікативних захворювань» представлено результати досліджень спектру мікроорганізмів, що є найбільш типовими у складі мікробіоти шлунково-кишкового тракту осіб з різними НКЗ.

Показано переважання певних груп мікроорганізмів за різних нозологій. Так, для атеросклерозу характерне збільшення кількості представників групи ЛПС-вмісних бактерій родів *Klebsiella*, *Proteus* та *Enterobacter*, імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus*, коменсальних *Streptococcus* spp. та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium*, представників групи ацетат- та пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides*, бутират-продукуючих бактерій *F. prausnitzii* та *R. intestinalis*, а також групи муциндеградуючої *A. muciniphila*.

Подібні тенденції, але зі збільшенням кількості бактерій роду *Lactobacillus* типові для пацієнтів з ожирінням. При ЦД-2 було характерним зменшення чисельності бактерій всіх зазначених груп.

При ССЗ ж спостерігалось збільшення кількості імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus* spp., коменсалів родів *Streptococcus* та *Staphylococcus*, ЛПС-вмісних бактерій родів *Proteus* та *Enterobacter*, а також дріжджеподібних грибів роду *Candida*, поряд із зниженням вмісту бактерій інших визначуваних груп.

Представлені результати можуть бути використані як мікробіологічні маркери для моніторингу стану здоров'я та прогнозування його змін, а також може бути покладено в основу розробки персоналізованого харчування.

Розділ 4 «Обґрунтування підбору індивідуального плану харчування для пацієнтів з ЦД-2» представляє результати досліджень з підбору складових для комплексної програми оздоровчого харчування осіб з цукровим діабетом 2 типу.

Зокрема, підібрано пробіотичну складову харчування – штами *L. paracasei* IMB B-7483, *L. casei* IMB B-7412 та *L. plantarum* IMB B-7414 та пребіотичні компоненти – антоціани і поліфеноли.

Вміст останніх визначено у рослин 10 видів, що дозволяє відмітити

грунтовний підхід до реалізації практичної цінності роботи. Так, визначено вміст вказаних сполук у плодах рослин та проаналізовано, яка з них може бути взята для включення у схеми харчування. Показано, що перевага має бути надана чорній смородині та чорниці, так як їх ягоди містять і поліфеноли, і антоціани у найвищих порівняно з іншими дослідженими рослинами концентраціях.

Розділ 5 «Результати спрямованої персоніфікованої корекції мікробіоти для лікування ЦД-2» присвячений дослідженню ефективності персоніфікованих схем харчування пацієнтів з цукровим діабетом другого типу.

У розділі представлено аналіз складу мікробіоти пацієнтів з ЦД-2, що дозволило отримати дані про переважні групи мікроорганізмів, присутність яких має бути скоригована.

Визначено, що до застосування персоніфікованих планів харчування мікробіота ротової порожнини характеризувалася переважанням лактобактерій, ентерококів та стрептококів, а також ряду інших бактерій, таких як *E. coli* (lac+), *Citrobacter* spp., *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *Bacillus* spp. та *Candida* spp. Після застосування індивідуальних схем харчування у пацієнтів дослідної групи спостерігали зниження кількості всіх представників кишкової мікробіоти, окрім лактобактерій, що характеризує схеми як оздоровчі. Те ж саме стосується і динаміки змін кишкової мікробіоти.

Встановлено також позитивний вплив на ряд біохімічних показників після 18 діб дотримання персоніфікованої дієти. Зокрема, статистично достовірно зменшилися наступні біохімічні параметри: глюкоза, тимолова проба, ліпіди наднизької щільності, креатинін та сечовина. Відмічені і зміни маркерів імунітету. Відмічено вплив і на фізикальні показники, який свідчить про покращення балансу організму. Все це підтверджує ефективність запропонованих планів харчування для оздоровлення пацієнтів з ЦД-2.

У розділі 6 «**Особливості сучасних підходів в діагностиці порушень мікробіому кишечника людини**» наведено ґрунтовний аналіз складу мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини, що заснований на результатах мікробіологічних, біохімічних, фізико-хімічних та молекулярно-генетичних досліджень. Це дає змогу дуже точно визначити особливості складу мікробіоти,

співвідношень окремих груп мікроорганізмів та їх функціональної ролі у можливих патологічних проявах.

Важливо, що цей аналіз дозволив визначити найбільш типові маркерні мікроорганізми, виявлення яких бактеріологічними методами може вважатися достатнім для діагностики складу мікробіоти та полягати у основі призначення персоніфікованої схеми харчування. Такий підхід є важливим для сучасної системи охорони здоров'я, де оптимальним підходом вважається отримання найбільш достовірного результату у найкоротший час з найменшими фінансовими витратами. Це ще раз підкреслює цінність роботи для практичного застосування.

Розділ 7 «Аналіз основних компонент як інструмент прогностичної персоніфікованої спрямованої корекції кишкової мікробіоти (на моделі ЦД-2)» присвячений аналізу показників стану пацієнта з метою визначення значущості цих маркерів для діагностики та прогнозування ефективності терапевтичних підходів щодо пацієнтів з НКЗ на прикладі цукрового діабету.

Виконаний аналіз є комплексним за своїм підходом: він базується на застосуванні статистичних підходів щодо 62 маркерів, які належать до однієї з 5 груп: біохімічні показники, показники кишкової мікробіоти, показники оральної мікробіоти, імунологічні показники та фізикальні показники. Для кожного з цих маркерів визначено значущість у загальній схемі діагностики та прогнозування ведення осіб з цукровим діабетом 2 типу. Це дозволило ранжувати показники та укласти список з 10 найбільш інформативних, що знов-таки дозволяє відмітити велике практичне значення роботи.

У розділі **«Аналіз та узагальнення результатів»** підсумовано головні результати роботи. Виконано аналіз власного доробку із залученням до обговорення значної кількості наукових джерел, що обґрунтовує та підкріплює отримані результати та свідчить на користь запропонованих автором схем харчування та запропонованих маркерів для діагностики та моніторингу ефективності лікування пацієнтів з НКЗ.

Ступінь обґрунтованості наукових положень.

Всі положення, презентовані у дисертаційній роботі, є науково

обґрунтованими. Для вирішення поставлених задач використовували репрезентативні методи, що дозволяють отримати точний результат. Отримані експериментальні дані опрацьовані з використанням загальноприйнятих методів математичної статистики. Висновки конкретні та вповні відображають основні результати роботи.

Ідентичність змісту автореферату і основних наукових положень дисертації.

Автореферат виконано з дотриманням вимог, що висуваються до підготовки авторефератів дисертацій.

Матеріали автореферату і дисертаційної роботи ідентичні. Зміст кожного розділу дисертації чітко окреслено у відповідних розділах автореферату.

До окремих зауважень можна віднести:

1. Певні розділи мають невдалу назву. Наприклад, «Результати дослідження...».

2. Методика молекулярно-генетичного аналізу мала бути представлена конкретним протоколом.

3. У розділі 4 є випадок посилання на власні друковані праці замість надання опису результатів у роботі.

4. Некоректне використання терміну: «нейроактивні бактерії». Є «бактерії, що продукують нейроактивні сполуки».

5. Серед висновків до розділу 7 бажано було навести кінцевий перелік з 10 маркерів, що є найбільш інформативними.

6. Розділи, присвячені викладенню результатів, містять елементи обговорення.

7. У тексті наявні одиничні граматичні та пунктуаційні помилки.

Перелічені зауваження не є істотними щодо суті проведених досліджень та сформованих висновків, вони не знижують наукової і практичної цінності дисертації.

У якості дискусії хотілося б отримати відповідь на наступні запитання:

1. Жінки є переважною групою обстежених. Це вказує на те, що вони група ризику за НКЗ?

2. Вік обстежених понад 39 років. Чому особи молодшого віку не були

включені у дослідження?

3. Чи проводили порівняння складу мікробіоти, визначеного для жителів Закарпаття, з таким у мешканців інших регіонів України? Наскільки він дійсно є особливим або можна екстраполювати отримані результати на всіх?

4. Чи досліджували, які будуть зміни мікробіоти після припинення курсу персоналізованого харчування або він розрахований на постійне застосування? Чи після завершення мікробіота перебуватиме у рівновазі чи буде ініційовано чергові зміни?

Резюмуючи викладене вище можна відмітити, що за своєю актуальністю, новизною, теоретичним та практичним значенням, об'ємом виконаних досліджень та повнотою викладу у публікаціях дисертаційна робота «Кишкова мікробіота за поширених некомунікативних захворювань людини та її персоналізована корекція при лікуванні пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу», відповідає вимогам пп. 9 та 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 р., а її автор Мелешко Тамара Вадимівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія (091 – біологія).

Професор кафедри загальної медицини
з курсом фізичної терапії
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара, докт. біол. наук

О.С. Воронкова

Підпис засвідчую:

Вчений секретар

Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара, к.ф.-м.н., доцент



Т.В. Ходанен