



Міністерство освіти і науки України Комунальний заклад вищої освіти “Вінницька академія безперервної освіти”

Кафедра екології, природничих та математичних наук

Вплив екологічних чинників на гомеостаз організму людини

Роботу виконав:

Глінка Валерій Володимирович

Науковий керівник:

*Поліщук В.М., кандидат
географічних наук, доцент,
доцент кафедри екології, природничих
та математичних наук*

КЗВО “Вінницька академія безперервної освіти”

Актуальність теми: Вживання пробіотиків, а також харчування, компонентами якого є продукти, що містять біологічно активні речовини (БАР), є найбільш впливовими зовнішніми чинниками, які формують мікробіоту попередження і лікування НКЗ шляхом коригування кишкової мікробіоти. Реалізація такого підходу потребує розв'язання цілого ряду нових наукових задач, пов'язаних із: вкрай недостатньою вивченістю специфіки порушень кишкового мікробіому при різних НКЗ.

Мета магістерської кваліфікаційної роботи – з'ясувати типові для поширених НКЗ індивідуальні співвідношення функціональних груп представників кишкової мікробіоти людини, біохімічних і імунних показників та реалізувати можливість експериментальної перевірки ідеї лікування НКЗ шляхом застосування коригуючих кишкову мікробіоту персоналізованих планів харчування.

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

Предмет дослідження – вплив мікробіоти кишечнику і ротової порожнини людини.

Завдання:

1. Дослідити індивідуальні та нозологієспецифічні співвідношення функціональних груп представників кишкової мікробіоти пацієнтів з атеросклерозом, ожирінням, ССЗ та ЦД-2 .
2. Виявити на моделі ЦД-2 існуючі зв'язки між показниками мікробіоти ротової порожнини та кишечника, біохімічними показниками крові та імунними показниками.
3. Реалізувати можливість конструювання планів харчування з персоніфіковано підібраними пробіотичними та багатими на БАР компонентами, що спрямовано модулюють кишкову мікробіоту.
4. У рандомізованому клінічному дослідженні оцінити реальну ефективність вказаних персоніфікованих планів харчування пацієнтів з ЦД-2 та з'ясувати динаміку показників мікробіот кишечника і ротової порожнини, а також біохімічних, імунних та фізикальних показників у процесі дослідження.

Матеріали і методи дослідження

Результати наукового дослідження впроваджені в лікувальний процес закладів охорони здоров'я: «Міська лікарня №3 м. Вінниці».

Теоретичні положення та практичні рекомендації магістерської роботи використовуються в навчальному процесі на кафедрах мікробіології, біологічної та загальної хімії, загальної гігієни та екології, нормальної фізіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Методи дослідження:

мікроскопічні (дослідження морфологічних і тинкторіальних властивостей бактерій); *фізико-хімічні*: спектрофотометричний метод (визначення сумарного вмісту БАР); *біохімічні* (визначення біохімічних показників сироватки крові пацієнтів); *молекулярно-генетичні* (кількісне визначення мікроорганізмів за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі); *імунологічні* (дослідження імунних показників пацієнтів з ЦД-2 за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА); *статистичні* (обробка отриманих результатів досліджень, пріоритизацію біомаркерів для ЦД-2 проводили з використанням кореляційного аналізу експериментальних даних, аналізу головних компонент, факторного та кластерного аналізу).

Теоретичне значення дослідження полягало в тому, що подано характеристика та визначення основних представників здорового мікробіому людини;

на основі проведено мікс-технологій дослідити зміни та властивості мікробіому людини за таких станів: вагітність, запальні процеси кишечника

Практичне значення одержаних результатів полягає у розробці їх корекції для прогностичної профілактики та лікування.

Результати дослідження апробовано в:

Глінка В.В., Поліщук В.М. Особливості дослідження біоти людини / Збірник статей викладачів, вчителів, студентів ступеня вищої освіти “магістр” та здобувачів наукового ступеня “доктор філософії” “Еколого-збалансований розвиток суспільства: стан, проблеми, перспективи: науково-методичне видання”. Редкол.: О.В. Мудрак (гол. ред.) та ін. Вінниця: КЗВО “ВАБО”, 2021. Випуск №3. С. 126-136.

На виконання **першого розділу** у магістерській кваліфікаційній роботі розглянуто сучасні уявлення про мікробіом людини.

Встановлено розвиток вчення про мікробіом, подана термінологія.

Проаналізовано формування мікробіому та його рання колонізація.

Встановлено, що одним із механізмів є регулювання імунної відповіді за допомогою мікробних метаболітів, КЛЖК володіють протизапальною дією за рахунок продукції активних форм кисню, секреції цитокінів, а також хемотаксису імунних клітин, визначено кишкову мікробіоту за умов цукрового діабету 2-го типу і кишкову мікробіоту за умов ожиріння.

На виконання **другого завдання** у магістерській кваліфікаційній роботі подано особливості сучасних підходів в діагностиці порушень мікробіому кишечника людини.

Подано характеристику серологічної діагностики та використання FISH аналізу або точної імунної діагностики.

Встановлено при виконанні дослідження вивчення типових особливостей кишкової мікробіоти при різних НКЗ, а також при дослідженні впливу спрямованої корекції мікробіоти шляхом застосування персоніфікованих планів.

На виконання **третього розділу** у магістерській кваліфікаційній роботі було розглянуто аналіз основних компонентів як інструмент прогностичної персоніфікованої спрямованої корекції кишкової мікробіоти (на моделі цд-2). **З'ясовано** застосування чотирьох видів аналізу: 1) кореляційний аналіз; 2) аналіз головних компонентів (Principal Component Analysis, PCA); 3) кластерний аналіз; 4) аналіз важливості показників за допомогою деревоподібної (tree-based) моделі класифікації даних.

Встановлено, що для Кластерного аналізу використовували повний набір експериментальних даних ГП1&18 (група з 35 пацієнтів, 1-й і 18-й дні дослідження).

Результати видової ідентифікації ізолюваних культур з нетиповими ферментативними властивостями

Результати MALDI-TOF типування ізолюваних культур з нетиповими
ферментативними властивостями

№ з/п	Результат первинної ідентифікації рутинними методами	Результат MALDI-TOF*
1	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2.396)*
2	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2.406)*
3	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Citrobacter koseri</i> (2.338)*
4	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2.094)*
5	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2.173) *
6	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2.199)*
7	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter aerogenes</i> (2.344)*
8	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter aerogenes</i> (2.258)*
9	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter cloacae</i> (2.364)*
10	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida tropicalis</i> (2.137)*
11	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida glabrata</i> (2.303)*
12	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida parapsilosis</i> (2.191)*

Примітка: * ≤ 2.000 : ідентифікація на рівні виду; 1.700-1.999: ідентифікація на рівні роду; ≥ 1.699 : невірно визначено.

Групами цих показників стану пацієнта

Групи досліджуваних показників стану пацієнтів

Номер групи	Назва групи
I	Біохімічні показники
II	Показники кишкової мікробіоти
III	Показники оральної мікробіоти
IV	Імунологічні показники
V	Фізикальні показники

Нумерований список досліджуваних показників стану пацієнтів

Група I

1. Амілаза
2. ЛФ
3. Білірубін
4. Глюкоза
5. Са
6. Тимолова проба
7. ХЛ
8. ЛПВЩ
9. ЛПНЩ
10. ЛПДНЩ
11. КФК
12. Залізо
13. Гамма-ГТ
14. АСТ
15. АЛТ
16. Загальний білок
17. Сечовина
18. Сечова кислота
19. К
20. Креатинін
21. ЛДГ
22. Na
23. HbA1c
24. Mg
25. Альбумін
26. КА
27. ТГ

Група II

28. *E. faecalis* (Fec)
29. *E. coli* (+) (Fec)
30. *E. coli* (-) (Fec)
31. *Lactobacillus spp.* (Fec)
32. *Proteus spp.* (Fec)
33. *E. cloacae* (Fec)
34. *Klebsiella spp.* (Fec)
35. *Citrobacter spp.* (Fec)
36. *P. aeruginosa* (Fec)

37. *S. aureus* (Fec)

38. *S. epidermidis* (Fec)

39. *Staphylococcus spp.* (Fec)

40. *Streptococcus spp.* (Fec)

41. *Bacillus spp.* (Fec)

42. *Candida spp.* (Fec)

Група III

43. *E. faecalis* (Sal)

44. *E. coli* (+) (Sal)

45. *Lactobacillus spp.* (Sal)

46. *Citrobacter spp.* (Sal)

47. *E. cloacae* (Sal)

48. *P. aeruginosa* (Sal)

49. *S. epidermidis* (Sal)

50. *Streptococcus spp.* (Sal)

51. *Bacillus spp.* (Sal)

52. *Candida spp.* (Sal)

Група IV

53. IgA

54. sIgA

55. II-10

56. TNF- α

57. IL-1 β

Група V

58. Маса

59. Обхват талії

60. Обхват стегон

61. Обхват верхньої частини стегон

62. ІМТ

Зауважимо, що у всіх випадках повний набір експериментальних даних, які аналізуються, є таблицею з 63 стовпчиками і 2·35 рядками для групи ГП (або 2·21 рядками для групи ГК). Один із її стовпчиків – день дослідження (1-й або 18-й), а інші 62 стовпчики містять відомості про ПСП. Рядки таблиці презентують кожного із пацієнтів відповідної групи, причому 2 рази (за кількістю часових зрізів експериментальних даних). Окрім зазначених повних наборів даних у ряді випадків аналізували й половинні набори, що складаються із даних 1-го або 18-го дня дослідження.

95 % довірчі інтервали для статичних коефіцієнтів кореляції

<i>r</i>	95% довірчий інтервал	
	Група пацієнтів (N = 35)	Контрольна група (N = 21)
0.50	0.20 ÷ 0.71	0.09 ÷ 0.77
0.55	0.27 ÷ 0.75	0.16 ÷ 0.79
0.60	0.33 ÷ 0.78	0.23 ÷ 0.82
0.65	0.40 ÷ 0.81	0.30 ÷ 0.84
0.70	0.48 ÷ 0.84	0.38 ÷ 0.87
0.75	0.56 ÷ 0.87	0.47 ÷ 0.89
0.80	0.64 ÷ 0.89	0.56 ÷ 0.92
0.85	0.72 ÷ 0.92	0.66 ÷ 0.94
0.90	0.81 ÷ 0.95	0.77 ÷ 0.96
0.95	0.90 ÷ 0.97	0.88 ÷ 0.98
0.99	0.98 ÷ 1.00	0.97 ÷ 1.00

З рисунків бачимо, що статичні і динамічні кореляції мало відрізняються між собою, що вказує на відсутність виразної динаміки змін ПСП у учасників контрольної групи протягом дослідження.

Всюди далі розглядатимемо лише групу пацієнтів, до яких застосовувалась процедура коригування мікробіоти. На рис. представлено —теплову діаграму матриці статичних коефіцієнтів кореляції, яка відповідає набору даних ГП1 (група пацієнтів, 1-й день досліджень), а на рис. – аналогічну діаграму статичних кореляцій, але для даних ГП18 (група пацієнтів, 18-й день досліджень). представлено —теплову| діаграму матриці динамічних коефіцієнтів кореляції, яка відповідає набору даних ГП1&18 (група пацієнтів, 1-й і 18-й дні досліджень разом).

З рисунків бачимо, що статичні кореляції 1-го і 18-го днів дослідження є помітно відмінними і до того ж кардинально відрізняються від динамічних кореляцій. Це вказує на наявність виразної динаміки змін ПСП у групи пацієнтів протягом дослідження.

У магістерській кваліфікаційній роботі досліджено та визначено типові особливості співвідношень основних функціональних груп кишкової мікробіоти осіб з атеросклерозом, ожирінням, ЦД-2 та ССЗ, а також підтверджено ефективність спрямованої корекції мікробіоти шляхом застосування персоніфікованих планів харчування.

1. В результаті обсерваційних клінічних досліджень встановлено, що для осіб з атеросклерозом характерним є збільшення кількості представників групи ЛПСвмісних бактерій родів *Klebsiella* (106 КУО/г), *Proteus* (105 КУО/г) та *Enterobacter* (107 КУО/г), імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus* (106 КУО/г) та коменсальних *Streptococcus* spp. (106 КУО/г), незначне перевищення норми для імуномодулювальних *E. coli* (108 КУО/г), а також зниження кількості нейроактивних та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium* (105 КУО/г), представників групи ацетат-пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides* (108 КУО/г), бутират-продукуючих бактерій *F. prausnitzii* (108 КУО/г) та *R. intestinalis* (108КУО/г), а також бактерій муциндеградуювальної групи – *A. muciniphila* (106 КУО/г).

2. Виявлено, що зменшення кількості ацетат- та пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides* (106 КУО/г), бутират-продукуючих бактерій *R. intestinalis* (106 КУО/г), нейроактивних та лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium* (107 КУО/г), муциндеградуювальних бактерій, таких як *A. muciniphila* (108 КУО/г), а також імуномодулювальних *E. coli* (103 КУО/г) поряд із збільшенням кількості нейроактивних, лактат-продукуючих бактерій роду *Lactobacillus* (109 КУО/г) та імуномодулювальних бактерій роду *Enterococcus* (108 КУО/г) можна вважати типовими для регіону індивідуальними особливостями кишкової мікробіоти пацієнтів з ожирінням.

3. Встановлено, що при ЦД-2 найбільш характерним співвідношенням основних функціональних груп мікроорганізмів для нашого регіону є зменшення чисельності імуномодулювальних бактерій, таких як *E. coli* (103 КУО/г), нейроактивних, лактат-продукуючих бактерій роду *Bifidobacterium* (105 КУО/г), ацетат-пропіонат-продукуючих бактерій роду *Bacteroides* (108 КУО/г), бутиратпродукуючих штамів *F. prausnitzii* (106 КУО/г) та *R. intestinalis* (108 КУО/г), а також групи муциндеградууючих бактерій, таких як *A. muciniphila* (106 КУО/г).

4. Для регіону дослідження виявлено типове співвідношення основних функціональних груп кишкової мікробіоти осіб з ССЗ, а саме: збільшення кількості таких імуномодулювальних бактерій, як *Enterococcus spp.* (106 КУО/г), коменсалів родів *Streptococcus* (106 КУО/г) та *Staphylococcus* (105 КУО/г), ЛПС-вмісних бактерій родів *Proteus* (105 КУО/г) та *Enterobacter* (104 КУО/г), а також дріжджеподібних грибів роду *Candida* (105 КУО/г), поряд із зниженням концентрації імуномодулювальних штамів, таких як *E. coli* (105 КУО/г), нейроактивних та лактатпродукуючих бактерій роду *Bifidobacterium* (107 КУО/г), ацетат-пропіонатпродукуючих бактерій роду *Bacteroides* (108 КУО/г), бутират-продукуючих штамів *F. prausnitzii* (105 КУО/г) та *R. intestinalis* (107 КУО/г), а також групи муциндеградуювальних бактерій, таких як *A. muciniphila* (106 КУО/г).

5. Визначено, що серед досліджених їстівних рослин з виразними пребіотичними властивостями, ягоди чорниці характеризуються найвищим вмістом поліфенольних сполук (421.6 ± 12.6 мг/100 г галової кислоти), а плоди чорної смородини – найвищим вмістом антоціанів (113.6 ± 3.4 мг/100 г галової кислоти).

6. Створені персоніфіковані плани харчування включають, зокрема, індивідуально підібрані пробіотики та рослинні продукти харчування з пребіотичними властивостями, що у сукупності забезпечує спрямовану дію на кишкову мікробіоту.

7. Запропонована нами спрямована корекція кишкової мікробіоти шляхом застосування персоніфікованих планів харчування у комплексному лікуванні пацієнтів з ЦД-2 клінічно підтвердила свою ефективність. Один із позитивних наслідків дотримання дієти пацієнтами дослідної групи полягав у нормалізації кишкової та оральної мікробіоти. Зафіксовано статистично значущі зміни кількостей представників кишкової мікробіоти (*E. faecalis*, *E. coli* (lac+), *E. coli* (lac-), *Lactobacillus spp.* та *Candida spp.*) та мікроорганізмів ротової порожнини (*E. faecalis*, *Lactobacillus spp.*, *P. aeruginosa* та *Candida spp.*).

8. Дотримання пацієнтами персоніфікованих планів харчування призводило також до статистично значущого: а) збільшення в крові рівнів сечової кислоти, Na, Mg, та зменшення кількостей глюкози, тимолової проби, ЛПДНЩ, креатиніну і сечовини; б) зниження рівнів імунних показників SIgA та TNF- α ; в) зменшення значень таких фізикальних показників: маса тіла, обхват талії, обхват стегон, обхват верхньої частини стегон та ІМТ.

9. На основі кореляційного, PCA і кластерного аналізу експериментальних даних та з використанням спеціально розробленої методики отримано впорядкований за важливістю показників перелік з 62 мікробних, біохімічних та імунних маркерів процесу персоніфікованого лікування ЦД-2 шляхом корекції кишкової мікробіоти. Найбільш репрезентативними маркерами виявились такі показники: *E. faecalis* (слина), TNF- α , креатинін, сечовина, тимолова проба, Na, *Lactobacillus spp.* (слина), *E. faecalis* (випорожнення кишечника), *E. coli* (lac -) (випорожнення кишечника), *Lactobacillus spp.* (випорожнення кишечника).

Дякую за увагу!