

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БІЛА ГАЛИНА ІГОРІВНА

УДК 576.3, 577.083.3, 577.27; 612.017.1:57.052

ДИСЕРТАЦІЯ

**УЧАСТЬ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ПОЗАКЛІТИННИХ ПАСТОК У ЗАПАЛЬНИХ
ПРОЦЕСАХ ТВАРИН ЗА ДІЇ НАНОЧАСТИНОК**

091 – «Біологія»

09 – «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Г.І. Біла

Науковий керівник: Віщур Олег Іванович, д.вет.н., професор

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Біла Г.І. Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія). – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2023.

Метою дисертаційної роботи було встановлення участі нейтрофільних позаклітинних пасток (НПП) в індукції запальних процесів у тілі тварин внаслідок контакту з ендогенними та екзогенними наночастинками (НЧ), розробка способів використання НЧ для керованого впливу на утворення НПП, пошуку засобів для таргетного впливу на нейтрофільні гранулоцити та їх здатності утворювати НПП, зокрема для використання НПП-індукуючих НЧ в складі вакцин нового покоління.

Вивчено дію двох типів НЧ – ендогенних, які спонтанно утворюються в гепатобіліарній системі внаслідок дієти, багатой на жири, холестерин та дієти багатой на фруктозу; та екзогенних, зокрема алотропних модифікацій вуглецю – нанодіамантів та графен оксиду. Для останніх не існує рецепторів в організмі, проте відома їх здатність індукувати утворення НПП. В роботі детально вивчалась можливість використання утворених кон'югатів НЧ та пептидів коронавірусів для швидкої генерації імунної відповіді до антигенів SARS-CoV-2 при введенні в організм.

Для проведення дослідження було створено модель неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) у лабораторних мишей за дії високоліпідної високохолестеринової дієти (ВЛВХД) та за дії високофруктозної дієти (ВФД). Обидві досліджувані дієти добре відображали вміст ліпідів, холестерину та фруктози, які притаманні «західній дієті» чи раціоні з високим вмістом фастфуду, смаженої їжі та солодких напоїв. За високого вмісту холестерину у присутності холевої кислоти дані сполуки кристалізуються в жовчних шляхах внаслідок

природних процесів концентрації жовчі, утворюючи нано- та мікрочастинки. В печінці фруктозу метаболізує ензим фруктокіназа С, яка діє швидко і не має механізму зворотнього зв'язку, що при споживанні великої кількості фруктози, яка присутня в солодких напоях, призводить до миттєвого падіння рівня АТФ у гепатоцитах, перетворюючи його в АМФ. Утворена АМФ вступає в шлях деградації пуринів через дію АМФ-деамінази, призводячи до утворення сечової кислоти та мітохондріальних оксидантів. Позбавлені енергії, внаслідок виснаження АТФ, гепатоцити із підвищеним рівнем мітохондріальних оксидантів схильні до загибелі і при порушенні їх цілісності сечова кислота потраплятиме у позаклітинний простір, де буде контактувати із високим вмістом іонів натрію, перетворюючись у моноурат натрію. Останній формує голчасті нано- та мікрочастинки, які є індуктором подагри через активацію НПП.

Для дослідження механізму утворення НПП використано спеціальну лінію мишей C57BL6/N, що експресували функціональний ген *pnt*, відповідальний за підвищений вміст мітохондріального НАДФН/НАДФ⁺, та характеризувались високим вмістом нейтрофільних гранулоцитів у крові із високою здатністю до утворення активних форм кисню (АФК). Перебування тварин на ВЛВХД та на ВФД спричиняло типові ознаки НАСГ уже через 4 – 6 тижнів, це значно менше ніж в інших описаних мишачих моделях НАСГ (12 – 18 тижнів).

Гістологічно підтверджено НАСГ у печінці тварин за ознаками накопичення ліпідів, появою мікровезикуляції, деградацією ядер, накопиченням колагену. Нами адаптовано кількісні підходи аналізу гістологічних зображень для оцінки ушкоджень тканин печінки мишей. Запропоновано прогресивний підхід верифікації ознак НАСГ печінки імуноферментним методом, який базується на молекулярних маркерах тесту ELF – Enhanced Liver Fibrosis розробки Siemens, адаптованому для мишей, за виявленням аміно-кінцевого пептиду проколагену III, тканинного інгібітора металопротеїназ-1 та гіалуронової кислоти.

Використовуючи запропоновані нами відтворювані та зручні моделі НАСГ в лабораторних мишей, ми дослідили участь нейтрофільних гранулоцитів у розвитку цих патологій. Виявлено інфільтрацію лейкоцитів та руйнування судин і жовчних

проток у гістологічних препаратах. Розроблено ефективний метод виявлення еозинофілів у гістологічних зразках за допомогою флуоресцентної мікроскопії, який дозволив диференціювати з поміж спостережуваних лейкоцитів нейтрофільні та еозинофільні гранулоцити. Встановлено, що серед інфільтруючих гранулоцитів у тканинах печінки переважають нейтрофіли.

Дослідження вмісту жовчних міхурів показало утворення в них значної кількості НПП та сильну нейтрофільну інфільтрацію за умов ВЛВХД та ВФД. Методом флуоресцентної та поляризаційної мікроскопії проаналізовано мікрокристали холестерину і встановлено, що вони у жовчному міхурі майже завжди вкриті компонентами НПП, – екстерналізованими волокнами ДНК та еластазою нейтрофілів (NE). Для відтворення впливу нанокристалів холестерину на утворення НПП використано модель стерильного запалення у мишей у формі повітряної кишені: введення в неї комерційних нанокристалів холестерину індукувало інфільтруючі нейтрофіли до утворення НПП навколо кристалів та стимулювало їх агрегацію.

Нами показано достовірне зростання активності еластази нейтрофілів за умов ВФД та ВХВЛД у сироватці крові тварин за ензиматичним розщепленням попередника флуоресцентного субстрату. Нейтрофільна інфільтрація в тканини печінки, поява НПП навколо кристалів холестерину у жовчних міхурах та зростання активності NE у сироватці за досліджуваних дієт спонукала нас дослідити можливі процеси формування НПП у капілярній сітці печінки з можливою оклюзією. Для цього завдання ми використали функціональний тест із моніторингу переходу барвника індоціаніну зеленого із кров'яного русла в жовч. Індоціанін зелений – це затверджений FDA інфрачервоний барвник для візуалізації кров'яного русла при операціях, для його детекції використовували аналізатор флуоресценції *in vivo* та флуоресценцію в інфрачервоному діапазоні при 820 нм. За флуоресценцією барвника визначали його кількість, накопичену в печінці протягом визначених інтервалів часу після внутрішньовенної ін'єкції. За умов ВЛВХД відзначено значне сповільнення накопичення індоціаніну у тканинах печінки у порівнянні з даними для тварин на стандартному раціоні.

На наступному етапі здійснили прижиттєве визначення активності NE у тілі живих тварин, які перебували на стандартному раціоні, ВЛВХД та ВФД. Для реалізації цього завдання ми використали новітню сполуку Perkin Elmer Neutrophil Elastase 680 FAST NIR fluorescent probe, яка представляє собою два інфрачервоні флуорофори, з'єднані між собою коротким пептидом, що містить сайт розщеплення еластазою нейтрофілів. Стеричне розміщення флуорофорів у нативній сполуці взаємно інгібує їх флуоресценцію, інгібування зникає при розщепленні специфічним ферментом. Введення барвника тваринам внутрішньовенно та в режимі реального часу дало змогу спостерігати флуоресценцію розщеплених субстратів. Активність еластази нейтрофілів значно зростала за ВЛВХД та ВФД і виявлялась не лише в тканинах печінки, а й селезінці та серці, що свідчить про системний характер запального процесу, спричинений зазначеними дієтами.

Щоб перевірити можливий вплив нейтрофілів на хронічні субгострі запальні процеси на системному рівні (low grade inflammation) дослідили зміни глікозилювання молекул IgG – вільних та в складі циркулюючих імунних комплексів. Зміна глікозилювання IgG зберігається впродовж часу півжиття молекули, і тому слугує хорошим індикатором повільних та слабо виражених запальних процесів. Спостерігали появу характерних прозапальних форм гліканів, які експонують залишок фукози в ядрі N-глікану в складі молекул IgG, за умов ВЛВХД. Аналогічні зміни глікозилювання ми відтворили *ex vivo* коли інкубували сироватку крові із утвореними НПП при 37°C, але не при 4°C, а зміни глікозилювання визначали лектино-блот аналізом, найбільші зміни глікозилювання спостерігали в ділянці легких ланцюгів молекул імуноглобулінів.

Щоб перевірити, чи оклюзія збірних жовчних проток утвореними НПП не виступає причиною накопичення жовчі, яка, як відомо, в надмірних кількостях ушкоджує гепатоцити, ми дослідили зразки печінки та плазми лабораторних щурів, що перебували на високохолестериновій дієті. У щурів відсутній жовчний міхур і відповідні великі протоки, де б могли накопичитись жовчні камені та спричинити оклюзію. За умов високохолестеринової дієти у щурів ми спостерігали як типові

ознаки НАСГ, так і майже трикратне зростання активності еластази нейтрофілів у сироватці крові. Отож ми зробили висновок, що утворення каменів у великих жовчних протоках не є причиною uszkodження тканин печінки. Очевидно, що активація нейтрофільних гранулоцитів та утворення НПП спричиняють оклюзію/запалення дрібних міжклітинних жовчних проток – холангіт.

На основі отриманих даних ми розробили стратегію запобігання uszkodженню тканин гепатобіліарної системи. На першому етапі зруйнували нейтрофільні гранулоцити мишей. Для цього мишам кожний другий день вводили 500 мкг антитіл анти-Ly6G клону 1A8, які зв'язуючись з рецептором нейтрофілів викликали їх лізис. Групі порівняння вводили анти-ізотипні (неспецифічні антитіла того ж субкласу імуноглобулінів) – 2A3. Тварини двох дослідних груп перебували на ВЛВХД, а контрольної – на стандартному раціоні. В обох груп тварин на ВЛВХД спостерігали зростання маси тіла, проте розрахований індекс uszkodження тканин печінки для стандартного раціону становив $1,62 \pm 0,24$, при ВЛВХД з неспецифічними антитілами – $75,6 \pm 9,6$, а при ВЛВХД за дії анти-нейтрофільних антитіл – $28,8 \pm 4,8$ ($p < 0.05$). Також спостерігали достовірне зменшення гіпертрофії гепатоцитів і вмісту у них ліпідів. Мікроскопічне дослідження вмісту жовчних міхурів показало значно менший вміст НПП за умов руйнування нейтрофілів, а ферментативне дослідження активності NE – достовірне зменшення її активності вдвічі та повернення до значень притаманних тваринам на стандартному раціоні. В жовчних міхурах, за допомогою поляризаційної мікроскопії, виявляли набагато менше кристалів холестерину. Отже, хоч видалення нейтрофілів і не запобігало метаболічному синдрому у мишей, проте воно значно зменшувало uszkodження тканин печінки.

Отримані нами результати щодо можливості використання антинейтрофільних антитіл для запобігання запалення в експериментальних умовах поставило перед нами виклик розробки методу, який можна було б застосовувати в практиці, пошуку агентів, здатних пригнітити утворення НПП в печінці, і при цьому спричиняти мінімальний побічний вплив. Тому ми здійснили пошук фармацевтично доступних препаратів для запобігання uszkodженню тканин

печінки. Свій вибір зупинили на інгібіторах агрегації НПП – гепарині (низькомолекулярний гепарин – фраксипарин), інгібіторі екстравазації нейтрофілів – метопрололі, інгібіторі мобілізації нейтрофілів з кісткового мозку – гранулоцит-колонієстимулюючому факторі (gCSF), які не чинили системного токсичного впливу. За дії метопрололу та gCSF спостерігали достовірне зменшення площі гепатоцитів, у порівнянні із тваринами на ВЛВХД без лікування, також зменшення вмісту жовчних каменів у міхурах. У ~30 % тварин за дії метопрололу виявляли лейкоцитарну інфільтрацію печінки, спленомегалію та інші видимі ознаки системного запалення. Такі ж ушкодження були і в деяких тварин за дії gCSF. Водночас за дії гепарину констатували достовірне зменшення накопичення ліпідів у гепатоцитах, визначених морфометрично, з наближенням вмісту ліпідних везикул до стану стандартного раціону ($p < 0.0001$). Для гепарину терапевтичний ефект виявлявся як для ВЛВХД, так і для ВФД. Більше того, за дії гепарину індекс фіброзу печінки, визначений за тестом ELF, в сироватках тварин після 5 тижнів перебування на ВЛВХД достовірно не відрізнявся від такого у контрольній групі, в той час як за ВЛВХД він був вищим ($p < 0.05$). Також дія фраксипарину спричиняла зменшення рівня NE в сироватці крові ($p < 0.05$) як за ВЛВХД, так і за ВФД.

Показано, що гепарин, на відміну від метопрололу, є відносно безпечним чинником, що запобігає ушкодженню тканин печінки НПП. Нормальне функціонування нейтрофілів у печінці є необхідною умовою реалізації вродженого імунного захисту від бактерій в кишківнику. Водночас блокування агрегації НПП очевидно дозволяє нейтрофільним гранулоцитам підтримувати стерильність тканинного середовища печінки та не дозволяє НПП агрегуватись і спричиняти холангіт у дрібних протоках.

Зважаючи на виявлену схильність нейтрофілів до взаємодії з гідрофобними часточками холевої кислоти нами вперше запропоновано механізм керованого таргетингу нейтрофільних гранулоцитів з використанням залишку холевої кислоти та флуоресцентної групи (для контролю таргетингу). Цей залишок, кон'югований до попередників ліків, здатних аутокаталізувати продукцію АФК було використано

для руйнування клітин із високим рівнем окисних процесів, таких як пухлинні клітини та нейтрофіли. Спеціально створені нашими партнерами із консорціуму NeutroCure (www.Neutrocure.eu) гібридні сполуки ефективно спричиняли загибель пухлинних клітин нейтрофільного генезу, проникаючи в клітину та накопичуючись в ендоплазматичному ретикулумі.

Досліджено можливість використання екзогенних НЧ для керованого утворення НПП. Ми виходили з наявних на початку роботи даних, що окремі види нанодіамантів та полістирольні частинки здатні індукувати НПП. Ми вирішили уточнити чи дана властивість притаманна іншим алотропним модифікаціям вуглецю, але не виявили її для НЧ графен оксиду. Цікаво, що ми спостерігали агрегацію введених нанодіамантів в організм тварин та їх поступове оточення, – спершу НПП, потім сполучною тканиною із наступною пасивацією. В такий спосіб організм відносно безпечно локалізував потенційно небезпечні НЧ. Водночас білкові антигени, введені одночасно з нанодіамантами, викликали в організмі тварин сильну імунну відповідь із утворенням антитіл та реактивних лімфоцитів, які виявляли за реакцією гіперчутливості сповільненого типу у мишей.

Зважаючи на гостру потребу у швидких способах генерації анти-коронавірусного імунітету, яка виникла під час пандемії коронавірусу, ми здійснили пошук пептидів, які б були притаманні різним коронавірусам, не зазнавали мутацій у нових штамів і генерували сильну імунну відповідь. Нами був запропонований пептид із ділянки HR2 Spike-білка коронавірусів, зокрема вірусу MERS (на той час даних про будову цих ділянок у вірусу SARS-CoV-2 не було), що спричиняв утворення антитіл при введенні в тіло мишей із нанодіамантами, що виступали в ролі ад'юванту вакцин.

Ми вперше в світі довели можливість існування перехресної гуморальної імунної відповіді до коронавірусів, протестувавши зв'язування сироваток конвалесцентних хворих на COVID із даним пептидом. Дане повідомлення було опубліковано на препринт сервері MedRxid 22 серпня 2020 року і сприяло у боротьбі з пандемією COVID.

Властивість НЧ індукувати НПП з транзиторною запальною реакцією ми використали для створення нановакцин. Для цього ковалентно кон'югували пан-коронавірусний пептид з поверхнею модифікованих нанодіаманів та використали кон'югати для імунізації мишей та кролів. Нанокompозити індукували утворення численних НПП у ділянці введення, що супроводжувалось транзиторною запальною реакцією із формуванням високих титрів імуноглобулінів класу IgG в сироватці крові та потужної клітинної відповіді уже на 32 день після першої імунізації. Титри імуноглобулінів зберігались високими принаймні упродовж 240 днів після імунізації у мишей та 120 днів – у кролів, а НЧ первинно вкриті НПП обростали клітинами сполучної тканини з морфологією фібробластів. В такий спосіб ми використали властивість НЧ індукувати НПП з транзиторною запальною реакцією для створення нановакцин.

Запропонований підхід має важливе значення для швидкої реакції на виникнення нових патогенів, адже дозволяє поєднати пептид любого невідомого патогену (після секвенування геному з наступним штучним синтезом пептиду) із НЧ та стимулювати утворення імунної відповіді, впливаючи на НПП.

Здобуті знання щодо особливостей впливу НЧ на НПП та їх використання у модулюванні запальних процесів були підсумовані нами в розділі тематичної монографії видавництва Springer, 2022.

Ключові слова: нейтрофільні позаклітинні пастки, гранулоцити крові, запалення, холестерин, імунна відповідь, наночастинки, мікрочастинки, ад'юванти, неалкогольний стеатогепатит, дієти, антитіла, вакцини, коронавірус, SARS-CoV-2.

SUMMARY

Bila G.I. «Involvement of neutrophil extracellular traps in the animal inflammatory processes under the action of nanoparticles» – a qualifying scientific work on the right of the manuscript.

Thesis for a Doctor of Philosophy Degree in the specialty 091 «Biology» (09 – Biology) – Institute of Animal Biology of the National Academy of Agrarian Sciences, Lviv, 2023.

The aim of the dissertation work was to establish the involvement of neutrophil extracellular traps (NETs) in the induction of inflammatory processes in animals and humans following contact with endogenous and exogenous nanoparticles (NPs), the development of methods for using NPs to control the formation of NETs, the search for means of targeted influence on neutrophil granulocytes and their ability to form NETs, particularly for the use of NET-inducing NPs in the composition of next-generation vaccines.

The action of two types of NPs was studied: endogenous ones, which are spontaneously formed in the hepatobiliary system as a result of a high-fat, high-cholesterol diet and a fructose-rich diet, and exogenous ones, including allotrope modifications of carbon – nanodiamonds and graphene oxide. The latter do not have receptors in the body, but their ability to induce the formation of NETs is known. The work thoroughly examined the possibility of using formed conjugates of NPs and coronavirus peptides for the rapid generation of an immune response to SARS-CoV-2 antigens upon administration into the body.

To conduct the study, a model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was created in laboratory mice using a high-lipid high-cholesterol diet (HLHCD) and a high-fructose diet (HFD). Both diets effectively reflected the content of lipids, cholesterol, and fructose typical for a «Western diet» or a diet with a high content of fast food, fried food, and sweet drinks. At the high cholesterol content in the presence of cholic acid, they tends to crystallize in the bile ducts as a result of natural bile concentration processes, forming nano- and micro-particles. In the liver, fructose is metabolized by the enzyme

fructokinase C, which acts rapidly and lacks a feedback mechanism. When consuming a large amount of fructose present in sweet drinks, it leads to an instant decrease in ATP levels in hepatocytes, converting it into AMP. The formed AMP induces the purine degradation pathway through the activation of AMP deaminase, resulting in the formation of uric acid and the generation of mitochondrial oxidants. Hepatocytes being deprived of energy due to ATP depletion and with elevated levels of mitochondrial oxidants are prone to cell death, and when their integrity is compromised, uric acid will enter the extracellular space, where it will come into contact with a high concentration of sodium ions, converting into monosodium urate. The latter forms needle-shaped nano- and micro-crystals, which are inducers of gout through the activation of NETs.

To investigate the mechanism of NETs formation, we used a special line of C57BL6/N mice expressing the functional *nnt* gene, responsible for increased mitochondrial NADPH/NADP⁺ content, and characterized by high levels of neutrophil granulocytes in the blood with a high ability to form reactive oxygen species (ROS). The animals exposed to HLHCD and HFD treatment exhibited typical signs of NASH within 4 – 6 weeks, which is significantly shorter compared to other described mouse models of NASH (12 – 18 weeks).

Histologically, NASH in the liver of the animals was confirmed by the accumulation of lipids, the appearance of microvesicular steatosis, nuclear degradation, and collagen accumulation. We adapted quantitative approaches for the analysis of histological images to assess tissue damage in the mouse liver. We proposed a progressive approach for verifying NASH liver markers using the immunoenzyme method based on molecular markers of the ELF – Enhanced Liver Fibrosis, test developed by Siemens, adapted for mice, detecting the amino-terminal peptide of procollagen III, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and hyaluronic acid.

Using the reproducible and convenient NASH models in laboratory mice that we developed, we investigated the involvement of neutrophil granulocytes in the development of these pathologies. Leukocyte infiltration and vessel and bile duct destruction were observed in histological preparations. We developed an effective method for detecting eosinophils in histological samples using fluorescence microscopy, which allowed differentiation between neutrophilic and eosinophilic granulocytes among

the observed leukocytes. It was established that neutrophils predominate among the infiltrating granulocytes in liver tissues.

Examination of gallbladder contents showed significant NETs formation and intense neutrophil infiltration under conditions of HLHCD and HFD. Microcrystals of cholesterol were analyzed using fluorescence and polarization microscopy, and it was found that they were almost always covered with NETs components, externalized DNA fibers, and neutrophil elastase (NE). To reproduce the influence of cholesterol nanocrystals on NETs formation, a sterile inflammation model in mice was used in the form of an air pouch: the introduction of commercial cholesterol nanocrystals induced infiltrating neutrophils to form NETs around the crystals and stimulated their aggregation.

We demonstrated a significant increase in neutrophil elastase activity under conditions of HLHCD and HFD in the serum of the animals by enzymatic cleavage of a fluorescent substrate precursor. Neutrophil infiltration into liver tissue, the presence of NETs around cholesterol crystals in gallbladders, and the increase in NE activity in the serum under the tested diets prompted us to investigate possible processes of NETs formation in the liver sinusoidal network with possible occlusion. For this purpose, we used a functional test for monitoring the transition of indocyanine green dye from blood vessels to bile. Indocyanine green is an FDA-approved infrared dye for visualizing blood flow during surgeries, and its detection was performed using *in vivo* fluorescence analysis and fluorescence in the infrared range at 820 nm. The dye's fluorescence determined its quantity accumulated in the liver during defined time intervals after intravenous injection. Under HLHCD conditions, a significant delay in indocyanine green accumulation in liver tissues was observed compared to the data for animals on a standard diet.

At the next stage, we conducted *in vivo* determination of NE activity in the bodies of living animals that were on a standard diet, high-lipid and high fructose diets. To accomplish this task, we used the latest compound, Perkin Elmer Neutrophil Elastase 680 FAST NIR fluorescent probe, which consists of two infrared fluorophores connected by a short peptide containing a neutrophil elastase cleavage site. The steric arrangement of the fluorophores in the native compound inhibits their fluorescence, and the inhibition disappears upon specific enzyme cleavage. Intravenous administration of the dye to animals in real-time allowed us to observe the fluorescence of cleaved substrates. Elastase

activity of neutrophils significantly increased with the HLHCD and HFD and was found not only in the liver but also in the spleen and heart, indicating a systemic inflammatory process caused by these diets.

To investigate the potential low-grade inflammatory effects of neutrophils at the systemic level, we examined changes in the glycosylation of IgG molecules, both free and as part of circulating immune complexes. Changes in IgG glycosylation persist throughout its circulation halftime and serve as a good indicator of low grade inflammatory processes. We observed the appearance of characteristic pro-inflammatory forms of glycans that expose a fucose residue in the N-glycan core of IgG molecules under HLHFD conditions. Similar changes in glycosylation were reproduced *ex vivo* by incubating blood serum with formed NETs at 37°C, but not at 4°C. Changes in glycosylation were determined by lectin-blot analysis, and the most significant changes in glycosylation were observed in the region of the light chains of immunoglobulin molecules.

To verify whether occlusion of the bile ducts by formed NETs is not the cause of bile accumulation, which, as known, damages hepatocytes in excessive amounts, we examined liver and plasma samples of laboratory rats on a high-cholesterol diet. Rats lack a gallbladder and corresponding large ducts where bile stones could accumulate and cause occlusion. Under high-cholesterol diet conditions, we observed both typical signs of NASH and almost a three-fold increase in neutrophil elastase activity in the serum. Therefore, we concluded that the formation of stones in large bile ducts is not the cause of liver tissue damage. Obviously, the activation of neutrophilic granulocytes and the formation of NETs lead to occlusion/inflammation of small intercellular bile ducts, cholangitis.

Based on the data obtained, we developed a strategy to prevent damage to the hepatobiliary system. In the first stage, we targeted the destruction of neutrophil granulocytes in mice. To do this, we administered 500 µg of anti-Ly6G antibody clone 1A8 every other day to the mice, which binds to the neutrophil receptor and induces their lysis. The control group received anti-isotype antibodies (non-specific antibodies of the same immunoglobulin subclass) – 2A3. Both groups were on a HLHCD, while the control group was on a standard diet. Both groups of animals on the HLHCD showed an increase

in body weight, but the calculated index of liver tissue damage for the standard diet group was 1.62 ± 0.24 , for the HLHCD with non-specific antibodies group was 75.6 ± 9.6 , and for the HLHCD with anti-neutrophil antibodies group was 28.8 ± 4.8 ($p < 0.05$). There was also a significant decrease in hepatocyte hypertrophy and in lipid content. Microscopic examination of the gallbladder contents showed a significantly lower cholesterol crystal content under conditions of neutrophil destruction, and enzymatic studies of NE activity showed a significant two-fold decrease and a return to values inherent in animals on a standard diet. Thus, although neutrophil removal did not prevent metabolic syndrome in mice, it significantly reduced liver tissue damage.

The results obtained regarding the possibility of using anti-neutrophil antibodies to prevent inflammation in experimental conditions posed a challenge for us to develop a method that could be applied in practice. We searched for pharmaceutically available drugs to prevent liver tissue damage. We chose inhibitors of NETs aggregation – heparin (low molecular weight heparin – fraxiparin), inhibitors of neutrophil extravasation – metoprolol, and inhibitors of neutrophil mobilization from the bone marrow – granulocyte colony-stimulating factor (gCSF), which did not exert systemic toxic effects. Metoprolol and gCSF led to a significant decrease in hepatocyte area compared to animals on the HLHCD without treatment, and a decrease in gallstone content was also observed. In approximately 30 % of animals treated with metoprolol, leukocytic infiltration of the liver, splenomegaly, and other visible signs of systemic inflammation were observed. Some percentage of gCSF-treated group was also affected. On the other hand, heparin treatment resulted in a significant decrease in lipid accumulation in hepatocytes, as determined morphometrically, with lipid vesicle content approaching that of the standard diet state ($p < 0.0001$). Therapeutic effects of heparin were observed for both HLHCD and normal diet conditions. Furthermore, under the action of heparin, the liver fibrosis index, as determined by the ELF test, in the serum of animals after 5 weeks on the HLHCD did not differ significantly from that of the control group, while it was significantly higher under the HLHCD alone ($p < 0.05$). Additionally, the action of fraxiparin resulted in a significant decrease in NE levels in the serum ($p < 0.05$) under both HLHCD and HFD.

It has been established that heparin, unlike metoprolol, is a relatively safe factor that prevents damage to the liver tissues of the hepatic portal system by NETs. The normal

functioning of neutrophils in the liver is a necessary condition for innate immune protection against intestinal bacteria. At the same time, blocking the aggregation of the hepatic portal system obviously allows neutrophilic granulocytes to maintain the sterility of the liver tissue environment and prevents the hepatic portal system from aggregating NETs and causing cholangitis in small ducts.

Considering the observed propensity of neutrophils to interact with hydrophobic particles of cholic acid, we have proposed for the first time a mechanism of targeting of neutrophilic granulocytes using a residue of cholic acid and a fluorescent group (for targeting control). This residue, conjugated to prodrug precursors capable of autocatalyzing the production of reactive oxygen species, was used to destroy cells with high levels of oxidative processes, such as tumor cells and neutrophils. Hybrid compounds specifically created by our partners from the NeutroCure Consortium (www.Neutrocure.eu) effectively caused the death of tumor cells of neutrophilic origin by penetrating the cell and accumulating in the endoplasmic reticulum.

We investigated the possibility of using exogenous NPs for controlled formation of NETs. We started with the available data indicating that certain types of nanodiamonds and polystyrene particles can induce NETs. We aimed to determine if this property is also present in other carbon allotropes but found no evidence of it for graphene oxide NPs. Interestingly, we observed aggregation of introduced nanodiamonds in animal bodies and their gradual encapsulation, – first by NETs, then by connective tissue with subsequent passivation. This allowed the relatively safe localization of potentially hazardous NPs in the body. Simultaneously, protein antigens co-administered with nanodiamonds triggered a strong immune response in the animal body, leading to the production of antibodies and reactive lymphocytes, which exhibited a delayed-type hypersensitivity reaction in mice.

Given the urgent need for rapid generation of anti-coronavirus immunity during the coronavirus pandemic, we conducted a search for peptides that would be common to different coronaviruses, unaffected by mutations in new strains, and capable of generating a robust immune response. We proposed a peptide derived from the HR2 region of the Spike protein of coronaviruses, specifically the MERS virus (as there was no information about the structure of these regions in the SARS-CoV-2 virus at the time). This peptide

induced antibody production when administered to mice along with nanodiamonds acting as vaccine adjuvants.

We were the first in the world to demonstrate the possibility of cross-reactive humoral immune response to coronaviruses by testing the binding of convalescent sera from COVID patients with this peptide. This finding was published on the preprint server MedRxiv on August 22, 2020, and contributed to the fight against the COVID pandemic.

We utilized the property of NPs to induce NETs with transient inflammatory reactions to create nano-vaccines. To achieve this, we covalently conjugated a pan-coronavirus peptide to the surface of modified nanodiamonds and used the conjugates to immunize mice and rabbits. The nanocomposites induced the formation of numerous NETs at the injection site, accompanied by transient inflammatory reactions and the generation of high titers of IgG antibodies in the serum, as well as a potent cellular response as early as 32 days after the initial immunization. Antibody titers remained high for at least 240 days in mice and 120 days in rabbits, and the NPs initially covered with NETs became surrounded by fibroblast-like connective tissue cells. Thus, we utilized the property of NPs to induce NETs with transient inflammatory reactions to create nano-vaccines.

This approach is of great significance for the rapid response to emerging pathogens, as it allows the combination of peptides from any unknown pathogen (after genome sequencing and subsequent peptide synthesis) with NPs to stimulate immune responses by influencing NETs.

The knowledge gained regarding the impact of NPs on NETs and their use in modulating inflammatory processes has been summarized in a chapter of a thematic monograph published by Springer in 2022.

Keywords: neutrophil extracellular traps, blood granulocytes, inflammation, cholesterol, immune response, nanoparticles, microparticles, adjuvants, non-alcoholic steatohepatitis, diets, antibodies, vaccines, coronavirus, SARS-CoV-2.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких опубліковані основні результати дисертації

Розділ монографії

1. Bila, G., Rabets, A., & Bilyu, R. (2022). Nano- and Microparticles and Their Role in Inflammation and Immune Response: Focus on Neutrophil Extracellular Traps. In *Biomedical Nanomaterials* (pp. 149–170). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76235-3_6. *(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, аналіз та узагальнення літературних даних, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

Статті у виданнях, що включені до наукометричних баз даних

Scopus та Web of Science

2. Bilyu, R., Pagneux, Q., François, N., Bila, G., Grytsko, R., Lebedin, Y., Barras, A., Dubuisson, J., Belouzard, S., Séron, K., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2021). Rapid Generation of Coronaviral Immunity Using Recombinant Peptide Modified Nanodiamonds. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(7), 861. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070861>. **Квартиль – Q2, IF = 4,531.** *(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

3. Xu, H., Schikora, M., Sisa, M., Daum, S., Janko, C., Alexiou, C., Bilyu, R., Klemt, I., Sellner, L., Gong, W., Schmitt, M., Bila, G., Mokhir, A. (2021). An endoplasmic reticulum - specific pro-amplifier of reactive oxygen species in cancer cells. *Angewandte Chemie* (International Ed. in English), 60, 11158–11162. <https://doi.org/10.1002/anie.202100054>. **Квартиль – Q1, IF = 15,336.** *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

4. Rabets, A., Bila, G., Grytsko, R., Samborskyu, M., Rebets, Y., Vari, S. G., Pagneux, Q., Barras, A., Boukherroub, R., Szunerits, S., & Bilyu, R. (2021). The Potential of Developing Pan-Coronaviral Antibodies to Spike Peptides in Convalescent COVID-19 Patients. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 69(1), 5.

<https://doi.org/10.1007/s00005-021-00607-8>. **Квартиль – Q2, IF = 3,831.**

(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).

5. Bilyu, R., Bila, G., Vishchur, O., Vovk, V., & Herrmann, M. (2020). Neutrophils as Main Players of Immune Response towards Nondegradable Nanoparticles. *Nanomaterials*, 10(7), 1273. <https://doi.org/10.3390/nano10071273>. **Квартиль – Q1, IF = 5,719.** *(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

6. Bila, G., Schneider, M., Peshkova, S., Krajnik, B., Besh, L., Lutsyk, A., Matsyura, O., & Bilyu, R. (2020). Novel approach for discrimination of eosinophilic granulocytes and evaluation of their surface receptors in a multicolor fluorescent histological assessment. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 92(2), 99–106. <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.099>. **Квартиль – Q4.** *(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

7. Paryzhak, S., Dumych, T., Mahorivska, I., Boichuk, M., Bila, G., Peshkova, S., Nehrych, T., & Bilyu, R. (2018). Neutrophil-released enzymes can influence composition of circulating immune complexes in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, 51(6), 1–7. <https://doi.org/10.1080/08916934.2018.1514390>. **Квартиль – Q2, IF = 2,957.** *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

Публікації у наукових фахових виданнях України

8. Біла, Г., Віщур, О., & Білий, Р. (2020). Високий вміст фруктози в раціоні призводить до утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у жовчних шляхах. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 89(1), 29–35. <https://doi.org/10.25040/ecpb2020.01.029>. *(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

9. Грицко, Р. Ю., Біла, Г. І., & Білий, Р. О. (2020). Що насправді означає тестування на коронавірус для пацієнта? *Інфекційні хвороби*, 100(2), 65–72. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2020.2.11287>. *(Дисертанткою особисто*

проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).

10. Парижак, С., Думич, Т., Біла, Г., & Білий, Р. (2019). Застосування моделі «повітряної кишени» для оцінки здатності імунних клітин локалізувати чужорідні нано- та мікрочастинки. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 85(1), 52–57. <https://doi.org/10.25040/ecpb2019.01.052>. *(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

11. Думич, Т., Парижак, С., Пешкова, С., Біла, Г., Луцик, М., Луцик, О., & Білий, Р. (2018). Чим корисна для організму загибель окремих клітин? *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 82(2), 77–85. <https://doi.org/10.25040/ecpb2018.02.077>. *(Дисертанткою особисто проведено аналіз та узагальнення матеріалів оглядової роботи, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

Препринт

12. Rabets, A., Bila, G., Grytsko, R., Samborsky, M., Rebets, Y., Vari, S., Pagneux, Q., Barras, A., Boukherroub, R., Szunerits, S., & Bilyu, R. (2020). Development of antibodies to pan-coronavirus spike peptides in convalescent COVID-19 patients. *MedRxiv*, 2020.08.20.20178566. <https://doi.org/10.1101/2020.08.20.20178566>. *(Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

Опубліковані праці апробаційного характеру

Тези у реферованих журналах

13. Bila, G., Vovk, V., Kril, I., Chopyak, V., & Bilyu, R. (2022). O 18. Hydrophobic nanoparticles as a novel adjuvant for protein-based anti-COVID-19 vaccines. *yEFIS 1st Symposium: Shaping the future of Immunology in Europe*, November 10–11, 2022, Berlin, Germany. *European Journal of Immunology*, 52(S2), 22. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202270200>.

14. Vaseruk, A., Bila, G., & Bilyu, R. (2022). P 83 IHC analysis of human neutrophil elastase during NETosis. *yEFIS 1st Symposium: Shaping the future of Immunology in Europe*, November 10–11, 2022, Berlin, Germany. *European Journal of*

Immunology, 52(S2), 123. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202270200>.

15. Bila, G., Vishchur, O., Vari, S., & Bilyu, R. (2021). P-0803 Neutrophil Extracellular Traps during high fructose diet leads to low-grade inflammation and direct liver damage. 6th European Congress of Immunology, September 1–4, 2021, Virtual meeting. European Journal of Immunology, 51(S1), 337. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202170200>.

16. Bilyu, R., & Bila, G. (2021). S-09.2-2 Plasma membrane and nanoparticles: love, hate and immune regulation. 45th FEBS Congress, July 3–8, 2021, Ljubljana, Slovenia. FEBS Open Bio, 11(S1), 66–67. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13206>.

Тези у збірниках матеріалів конференцій

17. Bila, G.; Vishchur, O.; Vari, S.; Bilyu, R. Direct in vivo visualization of activated neutrophils at low-grade inflammation caused by high-fat high-cholesterol diet. 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference. (Budapest, Hungary, April 21, 2023). – P. 124.

18. Біла Г. Нові неінвазивні методи оцінки ушкодження тканин печінки за неалкогольного стеатогепатиту в тварин. XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених. (Львів, 19 травня 2022 р.). – С. 23.

19. Bila, G.; Vovk, V.; Bilyu, R. Lung damage by nanoparticles at environmental pollution and COVID-19 disease. 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Annual Conference. (Prague, Czech Republic, April 8, 2022). – P. 140.

20. Schneider, M.; Bila, G.; Vovk, V.; Karavska, A.; Vishchur, O.; Bilyu, R. Novel methodology to assess liver damage from high fructose and high cholesterol diets. 4th RECOOP International Student Conference. (Prague, Czech Republic, April 7, 2022). – P. 39.

21. Біла, Г.; Віщур, О.; Білий, Р. Кількісна оцінка ушкоджень тканин печінки лабораторних мишей за умов високоліпідної високохолестеринової дієти з використанням імуноферментного аналізу. Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА). (Полтава, 8 жовтня 2021 р.). – С. 15–17.

22. Bila, G.; Lootsyk, M.; Mokhir, A.; Vishchur, O.; Bilyu, R. Targeting

granulocytic tumor cells with cholic acid prodrug conjugates. Proceedings of the 1st Ukrainian-Polish Scientific Forum AGROBIOPERSPECTIVES. (Lviv, September 29–30, 2021). – P. 13.

23. Кутняк, М.; Біла, Г. Участь нейтрофільних гранулоцитів в утворенні кристалів холестеролу у жовчних шляхах лабораторних мишей за високохолестеринової високоліпідної дієти. Materials of 81st Lviv Young Scientists International Conference. (Львів, 21–23 жовтня 2020 р.). – С. 32–33.

24. Каравська, А.; Магала, О.; Біла, Г. Кількісний підхід до оцінки ушкодження тканин печінки в моделі стеатогепатозу мишей. Materials of 81st Lviv Young Scientists International Conference. (Львів, 21–23 жовтня 2020 р.). – С. 29–30.

25. Bila, G.; Vovk, V.; Bilyu, R. Activation of neutrophils by natural nanocrystals underlies nutrition-related low-grade inflammation: How we can prevent gallstone formation? Proceedings of the 15th RECOOP Bridges in Life Science Video Conference (Online, October 2, 2020). – P. 104.

26. Schneider, M.; Bila, G.; Vovk, V.; Bilyu, R. High cholesterol and high fructose diets increase serum neutrophil elastase activity in laboratory mice. 3rd RECOOP International Student Video Conference. (Online, October 1, 2020). – P.17.

27. Біла, Г.; Пешкова, С.; Віщур, О.; Білий, Р. Утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у жовчному матеріалі за літогенних дієт у лабораторних тварин. Матеріали XVIII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини». (Львів, 5–6 грудня 2019 р.). – С. 97.

28. Matsyura, O.; Schneider, M.; Bila, G.; Peshkova, S.; Besh, L.; Lutsyk, O.; Bilyu, R. Novel approach for evaluation of cell surface IgE receptors on eosinophils using multicolor fluorescent histology. Materials of 10th RECOOP Annual Project Review Meeting. (Wroclaw, Poland, October 11–12, 2019). – P. 81.

29. Bila, G.; Peshkova, S.; Dumych, T.; Bilyu, R. Natural cholesterol nanocrystals in gall material and their interaction with neutrophilic granulocytes. Proceeding of the PhoBiA Annual Nanophotonics International Conference. (Wroclaw, Poland, May 15–17, 2019). – P. 62.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	26
ВСТУП.....	28
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	38
1.1. Позаклітинні нейтрофільні пастки та їх роль у розвитку запальних процесів...38	
1.2. Участь нейтрофільних позаклітинних пасток в іммобілізації мікрооб'єктів.....45	
1.3. Патології шлунково-кишкового тракту, в яких задіяні НПП.....46	
1.3.1. Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП).....46	
1.3.2. Природні наночастинки у шлунково-кишковому тракті.....49	
1.3.3. Роль фруктози в патології у розвитку запальних процесів.....51	
1.3.4. Можлива участь позаклітинних нейтрофільних пасток у запальних процесах шлунково-кишкового тракту.....53	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1. Серії досліджень.....	56
2.2. Об'єкт дослідження	60
2.2.1. Умови проведення дослідів.....	60
2.2.2. Забір біологічного матеріалу для дослідження.....	60
2.3. Тваринні моделі, використані у дослідженнях.....	61
2.3.1. Модель активації нейтрофілів у повітряній кишені.....	61
2.3.2. Модель індукції імунної відповіді (клітинної та гуморальної) у лабораторних тварин.....	61
2.2.3. Модель неалкогольного стеатогепатиту в лабораторних мишей.....	62
2.2.4. Раціони тварин.....	63
2.4. Методи дослідження.....	64
2.4.1. Спостереження за поведінковою реакцією тварин.....	64
2.4.2. Основні біохімічні показники сечі тварин.....	65
2.4.3. Забір та дослідження органів тварин.....	66
2.4.4. Виготовлення гістологічних препаратів.....	67
2.4.5. Гістологічний аналіз та фарбування гематоксилін-еозином.....	67

	23
2.4.6. Гістологічний аналіз вмісту колагену.....	68
2.4.7. Імуногістохімічний аналіз.....	68
2.4.8. Мікроскопія та мікрофотографування.....	69
2.4.9. Проточна цитометрія.....	70
2.4.10. Визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG та асоційованих імунних комплексів.....	70
2.4.11. Лектин-імуноферментний аналіз для визначення глікозилювання імуноглобулінів.....	71
2.4.12. Визначення вмісту специфічних імуноглобулінів IgG у зразках сироваток.....	72
2.4.13. Визначення індексу фіброзу у тварин методом ІФА.....	73
2.4.14. Виділення гранулоцитів із периферичної крові.....	73
2.3.15. Визначення еластази нейтрофілів в сироватці крові.....	74
2.3.16. Аналіз НПП за екстерналізацією ДНК.....	74
2.3.17. Мічення наночастинок та відстеження їх розподілу <i>in vivo</i>	75
2.3.18. Статистичний аналіз.....	75
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	77
3.1. Ендогенні наночастинки в гепатобіліарній системі та їх роль в активації нейтрофільних гранулоцитів та індукції запальної реакції.....	77
3.1.1. Тваринні моделі для дослідження НАЖХП.....	78
3.1.2. Патолофізіологічні зміни в організмі тварин за умов високоліпідної високохолестеринової дієти та високофруктозної дієти.....	81
3.1.2.1. Зміни маси тіла тварин за умов ВЛВХД.....	82
3.1.2.2. Поведінкові зміни тварин при ВЛВХД.....	83
3.1.2.3. Споживання їжі за умов ВЛВХД та ВФД.....	84
3.1.2.4. Зміни основних біохімічних показників сечі при ВЛВХД.....	85
3.1.3. Дослідження патологічних змін в печінці за ВЛВХД та ВФД.....	87
3.1.3.1. Динаміка розвитку ушкоджень органів при ВЛВХД та ВФД.....	93
3.1.3.2. Спосіб дискримінації нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів у гістологічних зразках.....	98

3.1.3.3. Інфільтрація тканин печінки гранулоцитами за ВЛВХД.....	100
3.1.4. Утворення НПП у гепатобіліарній системі за ВЛВХД та ВФД.....	101
3.1.4.1. Взаємодії нейтрофільних гранулоцитів з мікрочастинками холестерину в моделі стерильної повітряної кишені.....	107
3.1.5. Системні запальні реакції при ВЛВХД.....	108
3.1.5.1. Зміни циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові при ВЛВХД.....	108
3.1.5.2. Зміни глікозилювання молекул IgG у сироватці крові при ВЛВХД та ВФД.....	111
3.1.5.3. Активність еластази нейтрофілів у крові тварин на ВЛВХД та ВФД.....	114
3.1.5.4. Порухення екскреторних функцій гепатобіліарної системи за умов ВЛВХД.....	115
3.1.5.5. Активація еластази нейтрофілів у гепатобіліарній системі <i>in vivo</i> за умов ВЛВХД та ВФД.....	118
3.1.5.6. Роль оклюзії проток жовчного міхура в ушкодженні тканин печінки при високохолестериновій дієті.....	121
3.1.6. Стратегії запобігання ушкодженню тканин гепатобіліарної системи при ВЛВХД.....	123
3.1.6.1. Усунення нейтрофільних гранулоцитів за допомогою моноклональних антитіл та вплив гепатобіліарну систему при ВЛВХД.....	123
3.1.6.2. Запобігання ушкодженню тканин печінки шляхом керованого впливу на утворення НПП за допомогою фармакологічно доступних сполук.....	133
3.1.6.3. Потенційні терапевтичні шляхи впливу на патологічні нейтрофільні гранулоцити.....	145
3.2. Використання НПП для керованого посилення імунної відповіді.....	154
3.2.1. Використання моделі повітряної кишені для дослідження формування НПП за дії наночастинок.....	155
3.2.2. Утворення імунної відповіді на рекомбінантні антигени коронавірусів шляхом стимулювання утворення НПП.....	159
3.2.2.1. Пошук крос-реактивних антигенів коронавірусів.....	159

3.2.2.2. Створення кон'югатів наночастинок із пан-коронавірусними антигенами.....	165
3.2.2.3. Індукція утворення НПП за дії нанодіамантів.....	166
3.2.2.4. Імунна відповідь на створену імуногенну суміш.....	167
3.2.2.5. Довготривалі ефекти імунізації наночастинками, що індукують утворення НПП.....	169
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	174
4.1. Роль ендогенних наночастинок в активації нейтрофільних гранулоцитів.....	174
4.2. Ушкодження гепатобіліарної системи нейтрофільними позаклітинними пастками та шляхи його усунення.....	180
4.3. Стимулювання імунної відповіді за допомогою керованого впливу на НПП.....	187
4.4. НПП як модулятор системної імунної відповіді.....	191
ВИСНОВКИ.....	193
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	196
ДОДАТКИ.....	225

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АТ – антитіла;
- АФК – активні форми кисню;
- ВЛВХД – висококоліпідна високохолестеринаова дієта;
- ВФД – високофруктозна дієта;
- ВХД – високохолестеринаова дієта;
- ГК – гіалуринова кислота;
- ДАБ – 3,3' діамінобензидин;
- ЗФР, PBS – забуферний фізіологічний розчин;
- ІФА – імуноферментний аналіз;
- МП – метопролол;
- МПО – мієлопероксидаза;
- МЧ – мікрочастинки;
- НАЖХП – неалкогольна жирова хвороба печінки (від англ. Non-alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD);
- НАСГ – неалкогольний стеатогепатит (від англ. Non-alcoholic Steatohepatitis, NASH);
- НД, ND – нанодіаманти;
- НПП – нейтрофільні позаклітинні пастки (від англ. Neutrophil Extracellular Traps, NETs);
- НЧ – наночастинки;
- РБА – рекомбінантний білковий антиген;
- СД – стандартна дієта;
- ТМБ – тетра-метил-бензидин;
- ФР – фраксипарин;
- АВ – аніліновий синій;
- Alum – гідроксид алюмінію, Al(OH)₃;
- СFA/IFA – повний/неповний ад'ювант Фройнда;
- citH3 – цитрулінований гістон H3;

DAPI – 4',6-діамідіно-2-феніліндол;

DTH, delayed type hypersensitivity – реакція гіперчутливості затриманого типу, представляє опосередковану T2 клітинну відповідь;

FITC – флуоресцеїнізотіоціанат;

gCSF – гранулоцит-колонієстимулюючий фактор;

H&E – гематоксилін-еозин;

GO – графен оксид;

IgG – імуноглобулін IgG;

IgM – імуноглобулін IgM;

MERS-CoV – збудник близькосхідного респіраторного синдрому;

MSU – моноурат натрію (від англ. Monosodium urate);

NE – еластаза нейтрофілів;

OD – оптична щільність;

OVA – овальбумін;

PI – пропідій йодид;

PIINP – аміно-кінцевий пептид проколагену III;

PMA – форбол-міристил-ацетат;

RBC – еритроцити;

SARS-CoV-2 – коронавірус SARS-CoV-2, збудник коронавірусної хвороби людини (COVID);

TIMP-1 – тканинний інгібітор металопротеїназ-1.

ВСТУП

Актуальність теми. Нейтрофільні гранулоцити (або нейтрофіли), яких в людини щодня утворюється 100 мільярдів і час життя яких за останніми даними становить лише близько 8 годин, захищають людський організм кількома шляхами: вони поїдають ворожі бактерії (фагоцитоз) або виробляють токсичні речовини, здатні їх знищити (окисний вибух). У 2004 році було відкрито ще один механізм захисту – нейтрофіли деконденсують свої молекули ДНК, і сіткою з молекул ДНК іммобілізують патогени, утворюючи при цьому нейтрофільні позаклітинні пастки (НПП) [1]. Вивільнена ДНК взаємодіє із клітинною стінкою бактерій [2] і завдяки такій іммобілізації патогени безпосередньо контактують із цитотоксичними молекулами, вивільненими з нейтрофільних гранул. Виявлення НПП стало «гарячою темою» останнього десятиліття і їх вирішальну роль було доведено при боротьбі нейтрофілів з бактеріями, вірусами, грибами, гельмінтами [3]. А групою львівських дослідників, під керівництвом проф. Білого Р.О. – вперше показано участь НПП в іммобілізації наночастинок (НЧ) [4], локалізації вогнищ некрозу [5].

З часу перших повідомлень про «негативну» роль НПП (2012–2013 рр.), було переоцінено роль НПП в організмі, і на початок виконання дисертаційної роботи утвердилась думка, що роль НПП є як позитивною, так і негативною, а кількість утворених НПП потребує точного контролю [6, 7]. На жаль, точні засоби контролю рівня НПП в організмі, кровотоці чи окремих тканинах, були і залишаються малодослідженими. А початок епідемії COVID-19 ще більше підтвердив важливість НПП у фатальному ураженні легень. У квітні 2020 року вийшла перша наукова публікація, у якій вказувалося на вирішальну роль нейтрофілів та НПП в індукції тромбозу, патогенезі захворювання та провокуванні високої смертності у людей [8]. Надалі, з прогресом досліджень, стало зрозуміло, що НПП визначають перебіг захворювання та рівень ушкодження легень [9], і навіть визначаються як основний фактор, що спричиняє розвиток коронавірусної хвороби і смерть при інфікуванні людини вірусом SARS-CoV-2 [10]. Відсутність ефективних способів контролю формування НПП та запобіганню смертності, внаслідок спричинених

ними ушкоджень тканин та органів, обмежують терапевтичні можливості щодо коронавірусної хвороби у важкій формі. Тому, всебічне дослідження ролі НПП у тканинах є надзвичайно важливим, зважаючи на численні повідомлення про смертність від коронавірусу, спричинену коморбідними захворюваннями. Тобто, НПП, утворені в інших ділянках організму, можуть визначати перебіг COVID.

У 2019 році було показано, що НПП здатні індукувати утворення каменів у жовчних міхурах [11]. Кристали холестеролу поширені в організмі людини та можуть спонтанно з'являтися у просвітах жовчного міхура [12]. З іншого боку, нейтрофіли патрулюють жовчні протоки, оскільки вони з'єднують печінку з кишечником. Кишечник наповнений бактеріями і жовчні протоки не повинні стати шляхом поширення бактерій – це контролюють нейтрофіли. В роботі [11] показано, що кристали холестеролу в просвітах жовчного міхура можуть активувати нейтрофіли та ініціювати утворення НПП, а від так призвести до їх агрегації та формування каменів. Гідрофобні кристали холестеролу можуть розчиняти мембрану клітин [13] і, як було припущено в ході планування даної роботи, – ушкоджувати тканини печінки. Ушкодження може бути внаслідок як прямої дії, так і спричинене циркулюючими факторами. Адже відомо, що вільна позаклітинна ДНК також може слугувати тригером важких побічних реакцій в організмі людини, наприклад, утворення імунних комплексів із антинуклеарними антитілами (антитілами, які можуть зв'язуватися із ДНК) при системному червоному вовчаку (СЧВ) [14] або утворення комплексів із тромбоцитами, що веде до формування тромбів та закупорювання кровоносних судин [15]. Тож залишалось відкритим питання, чи вивільнені компоненти нейтрофільних гранул здатні ушкоджувати оточуючі тканини, включаючи циркулюючі компоненти крові та лімфи.

Водночас інші НЧ екзогенного походження – ті, що вдихаються з пилом, поглинаються з їжею чи ті, які вводяться з фармацевтичними препаратами, наприклад, інертні НЧ як ад'юванти вакцин, можуть мати подібний, раніше не досліджений, вплив на індукцію утворення НПП. Тому завдання перевірки ролі ендогенних НЧ у гепатобіліарній системі із ушкодженням тканин печінки стало одним із основних завдань роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота виконана в лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН та на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького в рамках науково-дослідних робіт «Вивчити біохімічні механізми формування та регуляції клітинного компартменту і гуморального імунітету у тварин за норми і патології» (Державний реєстраційний номер – 0116U001415), «Використання позаклітинних нейтрофільних пасток для модулювання запальних процесів» (Державний реєстраційний номер – 0119U101338), «Activation of neutrophils by natural body nanocrystals as a common disease mechanism underlying nutrition-related low-grade inflammation» («Активация нейтрофілів природними нанокристаллами організму як спільний механізм розвитку хронічного слабого запалення, спричиненого раціоном», грант Асоціації RECOOP HST) на підставі договору про наукову співпрацю. Робота була підтримана грантом фундації Фольксваген «Важливість ензимів нейтрофільного походження для процесингу ауто-антигенів та модулювання запального впливу» («The importance of neutrophil-derived enzymes for the processing of auto-antigens and inflammatory mediators») No. 97744, грантом програми Horizon2020 – FETOPEN проекту NeutroCure No. 861878 «Розробка «розумних» підсилювачів реакційноздатних сполук кисню специфічних для аномальних поліморфноядерних нейтрофілів для лікування запальних та аутоімунних захворювань, раку та мієлосупресії» («Development of «smart» amplifiers of reactive oxygen species specific to aberrant polymorphonuclear neutrophils for treatment of inflammatory and autoimmune diseases, cancer and myeloablation») та грантом EFIS (Європейської федерації імунологічних товариств) для участі в конгресі ECI-2021.

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала у визначенні ролі нейтрофільних гранулоцитів у розвитку запальних процесів організму тварин при взаємодії з НЧ. Зокрема, при взаємодії з ендогенними НЧ, які утворюються за літогенних дієт (із високим вмістом холестерину та фруктози) та встановлення ролі нейтрофілів в ушкодженні тканин печінки; а також при взаємодії

з екзогенними інертними НЧ з метою визначення можливості використання індукованої запальної реакції для посилення імунної відповіді на введені антигени.

Завдання дослідження:

1. Визначити динаміку ушкодження тканин печінки та компонентів крові (на прикладі циркулюючих імунних комплексів) за дії літогенних дієт із високим вмістом холестерину і фруктози та порівняти їх із ушкодженнями печінки у відомих моделях фіброзу (з використанням тетрахлорвуглецю).
2. Визначити динаміку утворення НПП за дії літогенних дієт з високим вмістом холестерину та фруктози.
3. Здійснити пошук фармакологічних сполук, здатних блокувати утворення НПП та блокувати ушкодження тканин печінки.
4. Оцінити можливості використання інгібіторів утворення НПП для запобігання ушкодженню тканин шлунково-кишкового тракту.
5. Оцінити імунну відповідь за дії екзогенних НЧ різної природи в ролі ад'юванта за їх введення в організм тварин разом з білковим антигеном.
6. Оцінити подальшу долю інертних НЧ в організмі після їх взаємодії з НПП.
7. Здійснити пошук НЧ-індукторів утворення НПП, здатних слугувати ад'ювантами, та оцінити можливість їх використання для індукції імунної відповіді до коронавірусу SARS-CoV-2.

Об'єкт дослідження: запальні процеси в організмі тварин та роль НПП у їх регуляції за дії ендогенних та екзогенних НЧ.

Предмет дослідження: біохімічні, імунологічні та гістологічні показники, асоційовані із розвитком запальної відповіді та ушкодженням тканин лабораторних тварин, за дії ендогенних та екзогенних наночастинок.

Методи дослідження: імунобіохімічні (визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG та імунних комплексів імуноглобулінів IgG-IgM у зразках сироваток крові та рівня їх глікозилювання, лектин-імуноферментний аналіз для визначення глікозилювання імуноглобулінів), гістологічні та цитологічні методи (забір, макро- та мікрофотографування жовчних міхурів, аналіз їх вмісту поляризаційною мікроскопією, фарбування гематоксилін-еозином (H&E),

фарбування по Домагку для визначення колагену, фарбування аніліновим синім), імуногістохімічні методи (виявлення НПП, екстерналізованої ДНК, еластази нейтрофілів та цитрулінованого гістону H3) та біохімічні методи (визначення ензиматичної активності еластази нейтрофілів за екстерналізацією ДНК та за розщепленням флуорогенних попередників, виявлення АФК, визначення вмісту білка в сечі, компонентів розщеплення клітинного матриксу печінки в сироватці крові– TIMP-1, PIIINP), біоінформатичний аналіз (аналіз послідовностей білків та пептидів, визначення локалізації антигенів), морфометричний аналіз мікрофотографій, статистична обробка результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано вплив ендогенних НЧ за дії літогенних дієт, спричинених високим вмістом фруктози та холестерину, на ушкодження тканин печінки за участі нейтрофільних гранулоцитів. Зокрема,

- показано зростання рівня активності еластази нейтрофілів у крові;
- виявлено нейтрофільні гранулоцити та НПП у мазках жовчі із жовчних міхурів мишей за літогенних дієт, що свідчить про наявність патрулюючих нейтрофілів, здатних виживати в агресивних середовищах жовчі;
- використано моделі тварин, що позбавлені жовчного міхура, – щурів, доведено, що ушкодження тканин печінки за високохолестеринової дієти не залежить від наявності жовчного міхура чи оклюзії основних вивідних жовчних проток, тобто ушкодження печінки є результатом оклюзії дрібних збірних жовчних каналців.

Продемонстроване явище важливе для розуміння стратегії терапії пацієнтів з НАЖХП після видалення жовчних каменів/проток/міхура.

Вперше констатовано, що за дії літогенних дієт відбувається не лише активація нейтрофільних ензимів у крові, а й зміна профілю гліканів імуноглобулінів із формуванням прозапальних імуноглобулінів (із збільшеним експонуванням фукози у складі глікану в корі молекули IgG), що вказує на розвиток системного запального процесу.

Вперше встановлено можливість зупинити ушкодження печінки тварин за

літогенних дієт, штучно усунувши нейтрофільні гранулоцити з організму тварин. Проведено скринінг фармакологічно доступних сполук, здатних впливати на НПП на різних етапах їх утворення та запропоновано два інгібітори НПП, здатні достовірно зменшити ушкодження печінки лабораторних тварин.

Вперше показано зростання імунної відповіді до синтетичних пептидів, зокрема пан-коронавірусних за дії екзогенних НЧ, здатних індукувати утворення НПП. Зокрема,

- створено імуногенну суміш на основі пан-коронавірусних пептидів та НПП-індукуючих нанодіамантів, що забезпечувала клітинну та гуморальну відповідь до SARS-CoV-2;
- показано, що активація НПП екзогенними НЧ супроводжується як клітинною, так і гуморальною реакцією. Титри утворених імуноглобулінів класу IgG зберігались на високому рівні в сироватці лабораторних кролів та мишей принаймні 120 днів;
- показано, що після введення НЧ як ад'ювантів у ділянках інтраперитонеальних та підшкірних ін'єкцій утворюються НПП, що секвеструють НЧ, запобігаючи їх поширенню в організмі. Згодом вони вкриваються капсулою із сполучної тканини. Дані структури надійно зберігались протягом усього життя тварин (більше року у лабораторних мишей), що може свідчити про безпечність використання НЧ як ад'ювантів.

В критичний час розвитку пандемії коронавірусу, вперше в світі (22.08.2020 р.) повідомили про існування перехресного гуморального імунітету до коронавірусів та визначили пептид HR2 домену S-білка, здатний активувати утворення антитіл в організмі людини до різних видів коронавірусів і який є потенційно консервативним у нових мутованих штамів.

Виявлені закономірності щодо ушкодження клітин печінки НПП, а також описані шляхи їх запобігання з використанням доступних фармакологічних препаратів, що впливають на НПП, відкривають нові шляхи розвитку терапії при НАЖХП. Описані ефекти посилення імунної відповіді шляхом активації НПП за допомогою екзогенних НЧ стануть не лише основою для розробки ад'ювантів

нового покоління, а й кращого розуміння виникнення запальних процесів та загострення хронічних запальних станів за дії таких забруднювачів як сажа, смог, пил, що особливо актуально в умовах війни в Україні.

Практичне значення отриманих результатів. В ході виконання завдань роботи вперше було створено модель неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) у мишей, що розвивається за 4 – 6 тижнів, в той час як наявні аналогічні моделі зумовлюють розвиток патології за 12 – 16 тижнів. Це відкриває цілу низку нових методологічних підходів до дослідження НАЖХП у лабораторних тварин та пошуку ефективних шляхів лікування даного захворювання.

Вперше описано спосіб дискримінації еозинофільних гранулоцитів та нейтрофільних гранулоцитів за допомогою відносно доступних підходів з використанням флуоресцентної мікроскопії. Розроблений метод був використаний в лікувальному процесі ВП «Лікарня святого Миколая», відділення старшого дитинства, центру алергології для визначення участі еозинофільних гранулоцитів у розвитку алергії до коров'ячого молока у дітей.

Вперше описано спосіб визначення зміни глікозилювання циркулюючих імунних комплексів та показано їх зв'язок з активацією еластази нейтрофілів в крові. Доведено участь нейтрофільних гранулоцитів у зміні експонування гліканів на імуноглобулінах IgG при хронічних запальних процесах, зокрема запропонований метод використано для доведення залучення НПП у розвитку хронічних запальних процесів при розсіяному склерозі.

Удосконалено комплексний тест на основі Enhances liver fibrosis test (Siemens) з метою виявлення фіброзу печінки для діагностики ушкодження печінки в лабораторних мишей. Для цього створено специфічні антитіла до гіалуронової кислоти. Запропонований тест використовує метод імуноферментного аналізу (ІФА) і не покладається на визначення ензиматичної активності печінкових ферментів. Це забезпечує його надзвичайну надійність та відтворюваність, і щонайважливіше – надає науковій спільності кількісний малоінвазивний підхід (аналіз зразків сироватки крові) до моніторингу ушкоджень тканин печінки у створеній мишачій моделі НАЖХП.

За результатами проведених експериментів показано, що визначний вплив на активацію НПП має саме фізичний розмір та гідрофобна поверхня як ендогенних, так і екзогенних НЧ; отож, імітуючи дану поверхню можна забезпечити активацію утворення НПП. Вперше створено хімічні сполуки, спрямовані на таргетинг мембран нейтрофілів, використовуючи похідне холестеролу, кон'югація якого з потенційними раковими препаратами забезпечила ефективне попадання сполук у клітини, що продукують високі рівні активних форм кисню (АФК) (зокрема, нейтрофіли, пухлинно-асоційовані нейтрофіли та пухлинні клітини), що виявлялось у сильній цитотоксичній дії щодо патологічних клітин.

Використовуючи технологію аналізу флуоресценції *in vivo*, вперше розроблено шляхи для оцінки ефективності роботи гепатобіліарної системи, що ґрунтуються на кількісному аналізі рівня флуоресценції індоціану зеленого за швидкістю преходу із крові в жовч. Розроблений метод є повністю неінвазивним та дозволяє здійснювати оцінку стану гепатобіліарної системи лабораторних тварин.

В ході виконання роботи отримані мікрофотографії НПП у різних середовищах, зокрема на поверхні жовчних міхурів, які підтверджують гіпотезу про наявність клітин (нейтрофільних гранулоцитів) у жовчних шляхах і заперечують усталене уявлення про те, що клітини не можуть існувати в середовищі жовчі. Отримані мікрофотографії опубліковано на обкладинці журналу Праці Наукового товариства імені Шевченка. Медичні науки, том 55 № 1 (2019): (<https://doi.org/10.25040/ntsh2019.01>).

Впровадження результатів дослідження. В результаті виконання роботи розроблено метод «Індукції імунної відповіді з використання гідрофобних наночастинок, здатних активувати утворення НПП». Дане ноу-хау розробників стало основою для розпочатого проекту МОЗ України «Імуногенність та специфічність суміші білкових антигенів і нанoad'ювантів *ex vivo*» (Державний реєстраційний номер – 0122U000974, 2022 – 2024 рр), спрямованого на створення ефективних національних вакцин. Запропонований метод швидкої генерації імунної відповіді ліг в основу пакету завдань грантової заявки LungCare, поданої та підтриманої до фінансування в рамках конкурсу HORIZON-TMA-MSCA-SE

Staff Exchanges 2022, код проекту – 101129095, автор роботи є відповідальним виконавцем пакету завдань щодо реалізації запропонованої ним ідеї.

Основні наукові та практичні результати дисертаційної роботи впроваджені в практичну діяльність Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Вроцлавського університету науки і техніки, у навчально-педагогічний процес кафедри гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, у лікувальний процес ВП «Лікарня святого Миколая», відділення старшого дитинства, центру алергології (додаток А).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною науковою працею дисертанта. Автор особисто провела аналіз наукової літератури за темою дисертаційної роботи, виконала комплексне дослідження зразків біологічного матеріалу тварин. Самостійно здійснила формування та обробку первинної документації, провела статистичну обробку та аналіз отриманих результатів дослідження. Приймала безпосередню участь у проведенні імунобіологічних досліджень. Дисертантом самостійно написані всі розділи дисертації, сформульовані загальні висновки та практичні рекомендації, забезпечено їх висвітлення в періодичних виданнях. Спільно з науковим керівником визначені мета та завдання дисертаційної роботи, розроблені план, дизайн дослідження, обговорені отримані результати та здійснено впровадження результатів дослідження в медичну практику.

Консультативну допомогу та сприяння при виконанні імунобіологічних лабораторних досліджень за темою дисертаційної роботи надав д.біол.н., професор кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького Білий Ростислав Олександрович.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень та основні положення дисертаційної роботи було представлено на PhoViA Annual Nanophotonics International Conference (Вроцлав, Польща, 2019), 10th RECOOP Annual Project Review Meeting (Вроцлав, Польща, 2019), XVIII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів,

2019), 3rd RECOOP International Student Video Conference (2020), 15th RECOOP Bridges in Life Science Video Conference (2020), 81st Lviv Young Scientists International Conference (Львів, 2020), 45th FEBS Congress (Любляна, Словенія, 2021), 6th European Congress of Immunology (Стамбул, Туреччина, 2021), 1st Ukrainian-Polish Scientific forum AGROBIOPERSPECTIVES (Львів, 2021), Всеукраїнській міждисциплінарній науково-практичній конференції з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА) (Полтава, 2021), X міжнародній науково-практичній конференції Різдвяні читання у Львові «COVID-19, long-COVID-19, постковідний синдром: їх багатолікість та імунні порушення» (Львів, 2021), 4th RECOOP International Student Conference (Прага, Чеська Республіка, 2022), 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Annual Conference (Прага, Чеська Республіка, 2022), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасний світ та інфекційні хвороби. Медицина подорожей» (Київ, 2022), XX Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених (Львів, 2022), уEFIS 1st Symposium: Shaping the future of Immunology in Europe (Берлін, Німеччина, 2022), 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference (Будапешт, Угорщина, 2023).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 29 наукових праць, а саме: 1 праця у колективній монографії у співавторстві; 10 статей, зокрема 6 статей, в міжнародних реферованих журналах, індексованих у Scopus і Web of Science (серед них 5 статей з імпаکت-фактором) та 4 статті у наукових фахових виданнях, затверджених МОН України; 1 препринт; 17 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій, конгресів, форуму, симпозіуму та інших наукових заходах, серед них 14 – міжнародних, зокрема 4 тез опубліковані в міжнародних реферованих журналах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, власних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота викладена на 232 сторінках рукопису, обсяг основного тексту складає 165 сторінок. Дисертація містить 6 таблиць, 84 рисунки, 285 джерел цитованої літератури (14 кирилицею і 271 латиницею) та 3 додатки.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Позаклітинні нейтрофільні пастки та їх роль у розвитку запальних процесів

Деяким клітинам притаманні специфічні форми загибелі, пов'язані з їхніми функціями та розташуванням, які водночас супроводжуються значними змінами поверхні клітини. Для нейтрофільних гранулоцитів крові (нейтрофілів), відносно нещодавно було виявлено новий специфічний шлях загибелі – утворення НПП, англ. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) [1].

Уже понад сто років відомо, що основна функція нейтрофілів пов'язана із фагоцитозом мікроорганізмів, утворенням АФК для нейтралізації поглинутих патогенів із вивільненням антимікробних сполук. Проте при гострій запальній реакції ця стратегія є неефективною. 19 років тому було показано, що у нейтрофілів існує альтернативний механізм захисту організму, який дозволяє вловлювати як великі кількості бактерій, так і набагато більші об'єкти – від НЧ до гіф грибів. Цей механізм реалізується через активне руйнування зв'язків ДНК з гістонами, що призводить до швидкої деконденсації ДНК та захоплення сторонніх частинок вивільненим хроматином, декорованим токсичними білками, що походять із нейтрофільних гранул [16]. Вивільнені ДНК та гістони схожі на «риболовецькі» сітки та отримали назву НПП [1].

Сучасні уявлення про функціонування нейтрофілів підсумовані на рис. 1.1 за даними [17]. Переходячи із циркуляції в тканини/ділянку запалення за механізмом хемотаксису нейтрофіли можуть: 1) продукувати АФК; 2) гинути шляхом апоптозу (оскільки ця загибель супроводжується утворення великої кількості протизапальних молекул, даний шлях призводить до стихання запалення); 3) здійснювати фагоцитоз часточкових об'єктів – патогенів; 4) дегранулюватись, вивільняючи вміст своїх гранул у міжклітинний простір, що може чинити як протимікробний, так і регуляторний вплив; 5) утворювати НПП [17]. Зокрема, сучасна методологія досліджень дозволила зрозуміти, що: 1) час життя більшості

нейтрофілів в циркуляторному руслі є набагато коротшим ніж вважалось [18] і складає менше 7 годин [19]; 2) в крові перебуває лише частина нейтрофілів організму, близько половини, велика частина нейтрофілів знаходиться в тканинах та на поверхні слизових оболонок, які вони активно патрулюють [20, 21]; 3) після контакту з окремими об'єктами нейтрофіли можуть дегранулюватись та/або повертатись до кісткового мозку (і, можливо, селезінки), при цьому значно продовжується життя нейтрофілів і вони стають регуляторними імунними клітинами (нейтрофіли низької густини, пухлинно-асоційовані нейтрофіли, супресорні клітини міелоїдного походження нейтрофільного типу, англ. MDSC-N, або MDSC-PMN) [20, 22–24].

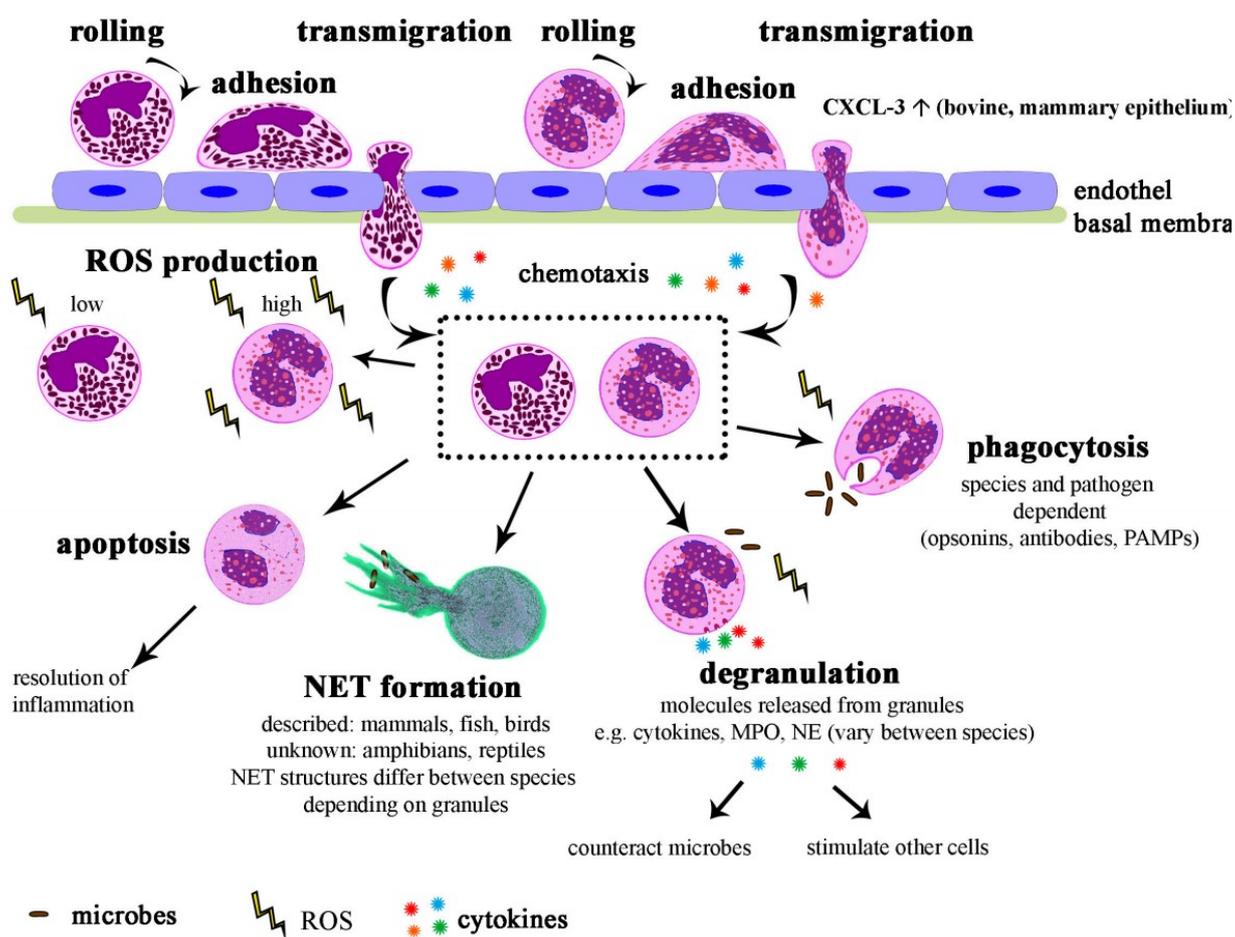


Рис. 1.1. Основні способи захисту організму, що їх забезпечують нейтрофільні гранулоцити людини, за даними [17]: апоптоз, фагоцитоз, дегрануляція, утворення АФК, утворення НПП

Слід зазначити, що такий суїцидний тип клітинної загибелі є доцільним для

нейтрофілів, адже це термінально диференційовані клітини, які не здатні до проліферації, з коротким періодом півжиття. Високосегментоване ядро дозволяє нейтрофілам легко виходити з капілярів та проникати в тканини з високою швидкістю. Нейтрофіли патрулюють епітеліальні поверхні тіла та різноманітних проток. Вони альтруїстично жертвують собою та вивільняють цитотоксичний вміст, що зупиняє інвазію патогенів. Таким чином, утворення НПП служить для захисту організму. Вивільнений хроматин не лише дозволяє безпосередньо іммобілізувати небезпечні та чисельно переважаючі бактерії і зупинити їхнє поширення, але й знешкоджувати об'єкти, що є надто великими для фагоцитозу (наприклад, гіфи грибів) [17].

НПП здатні захоплювати сторонній інертний матеріал, зокрема, кристали моноуратів натрію, що утворюються при подагрі [25], або штучні НЧ, які при попаданні у тіло людини не можуть бути зруйновані чи видалені [4]. Наприклад, нанодіаманти або полістиренові НЧ, призводять до активації нейтрофілів та подальшого формування НПП у ділянці обмеженого запального процесу [26]. Під час деяких гострих запальних процесів внутрішніх органів, зокрема при гострому некротичному панкреатиті, виникає масивний некроз тканин – утворюються панкреатичні псевдокісти [27]. На відміну від звичайних кіст, ці псевдокісти не оточені шаром епітелію. Дослідження зразків внутрішніх органів хворих із гострим запаленням органів черевної порожнини дозволило виявити межу між інтактними та некротизованими тканинами та показати, що некротизовані ділянки ізольовані від сусідніх здорових тканин агрегованими НПП [5]. У деяких випадках ензими нейтрофільних гранул здатні руйнувати прозапальні цитокіни в ділянці НПП, обмежуючи цим запальний процес [25].

Ще за десятки років до опису нейтрофільних пасток було відомо, що некротичні клітини є джерелом позаклітинної ДНК та пов'язаних з нею гістонів [28]. На сьогодні вважається, що позаклітинний викид ядерного матеріалу, який раніше слугував ознакою цитолізу [29], є характерним маркером нейтрофільних пасток. Спочатку дослідники намагалися відокремити утворення нейтрофільних пасток від специфічних форм клітинної смерті [1, 30]. Однак брак чітких критеріїв

дефініції нейтрофільних пасток призвів до того, що будь-який процес, у якому задіяне вивільнення ядерного та цитоплазматичного вмісту з нейтрофілів [31–35] незалежно від механізму його запуску, вважається ознакою формування НПП.

Цитоліз, індукований ендогенними (перфорином та комплементом) і бактерійними (токсинами) пороутворювальними протеїнами, є механізмом самозахисту, який, зазвичай, використовують імунокомпетентні клітини та вірулентні бактерії для атаки на небажані клітини [36]. Також утворення дискретних пор у плазматичній мембрані нейтрофілів (за допомогою електропермеабілізації) сприяє позаклітинному вивільненню ядерної ДНК, з'єднаною з мієлопероксидазою (МПО), що свідчить про те, що неспецифічний цитоліз викликає зміни нейтрофілів, які наразі неможливо відрізнити від нейтрофільних пасток [37]. Однак, на відміну від нейтрофільних пасток, пороутворюючі протеїни викликають значний викид кальцію, який гіперактивує пептидиларгінін деімінази, що спричиняє гіперцитрулінування нейтрофілів (процес носить назву лейкотоксичного гіперцитрулінування), який, імовірно, використовується вірулентними бактеріями для інактивації нейтрофілів [38, 39]. У той час як цитрулінування, правдоподібно, не є абсолютно необхідним для утворення нейтрофільних пасток у людини [39–42], цей процес забезпечує деімінування аргініну з утворенням цитруліну, що зменшує позитивний заряд гістонів і, відповідно, – спорідненість ДНК до гістонів, сприяючи деконденсації ДНК. Тому в більшості нейтрофільних пасток можна помітити обмежене цитрулінування гістонів, подібне до того, яке викликається іншими діями та причинами смерті [39, 41, 43]. Таким чином, для виявлення НПП слід використовувати насамперед морфологічні критерії – сітки із ДНК, поєднуючи їх з детекцією специфічних маркерів процесу утворення НПП – позаклітинної ДНК, нейтрофільної еластази, МПО та цитрулінованих гістонів, зокрема гістону H3 [44].

Незважаючи на важливість детекції НПП, вони часто ігноруються в рутинному аналізі крові, а автоматичні гемоаналізатори також не містять відповідних команд для їхньої детекції. До прикладу, нами було стимульовано процес утворення НПП у лейкоконцентрах людини (рис. 1.2) і клітини, що

поглинули бактерії, здебільшого були правильно ідентифіковані лікарями-діагностами. Водночас, слід зауважити, що сучасні рекомендації вказують на необхідність ігнорування в процесі підрахунку «нерозпізнаних» об'єктів, якими виступають і новоутворені позаклітинні пастки (рис. 1.2), за матеріалами [44]. На рис. 1.2 показано мазок крові людини з нейтрофільними гранулоцитами в лейкоцитарному концентраті після додавання культури бактерій. Деякі з них (помаранчеві стрілки) поглинули бактерії, а інші утворили нейтрофільні пастки (зелені стрілки).

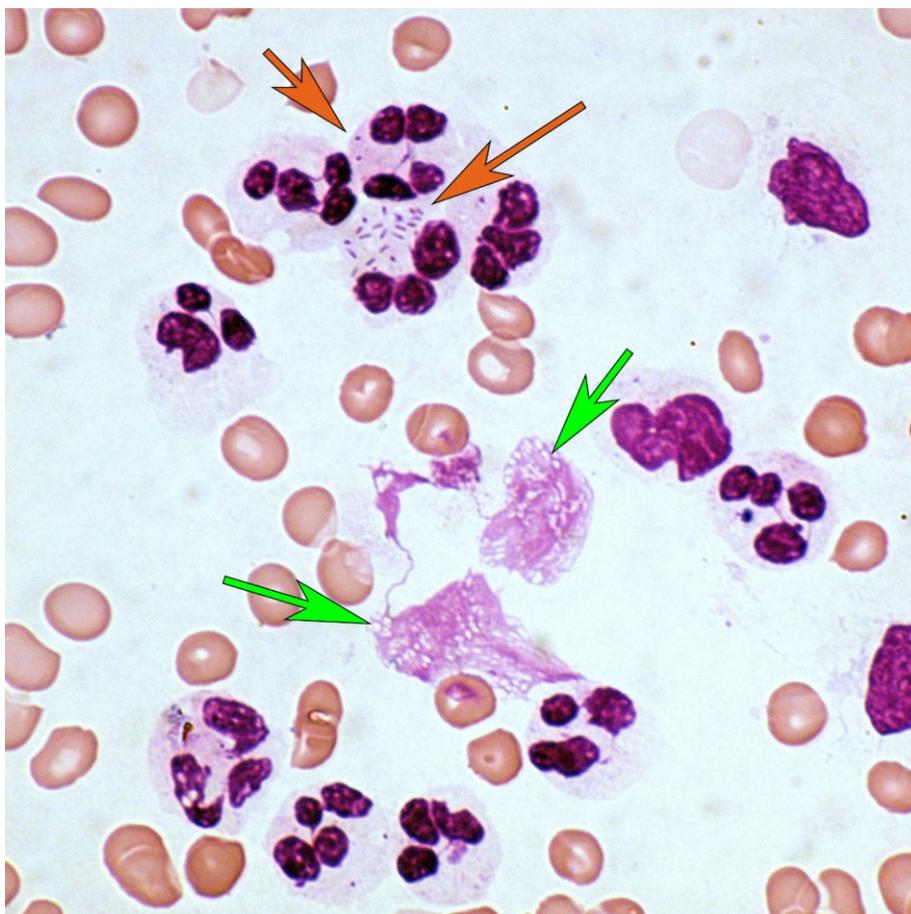


Рис. 1.2. Дві форми захисних реакцій нейтрофілів: утворення НПП (зелені стрілки) та фагоцитоз бактерій (помаранчеві стрілки), за матеріалами [44]

Також доволі ефективним є виявлення процесів утворення НПП шляхом цитологічних відбитків із поверхні епітелію, зокрема в ділянках запалення, з наступним забарвленням розчином пропідій йодиду (1 мкг/мл) упродовж 10 хв з наступною детекцією за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Цей підхід дозволяє побачити як окремі нейтрофіли, що утворюють НПП, так і агреговані

нейтрофільні пастки (рис. 1.3). Великі НПП можуть займати площу в кілька сотень квадратних міліметрів і вкривати поверхню цілих органів, захищаючи організм господаря.

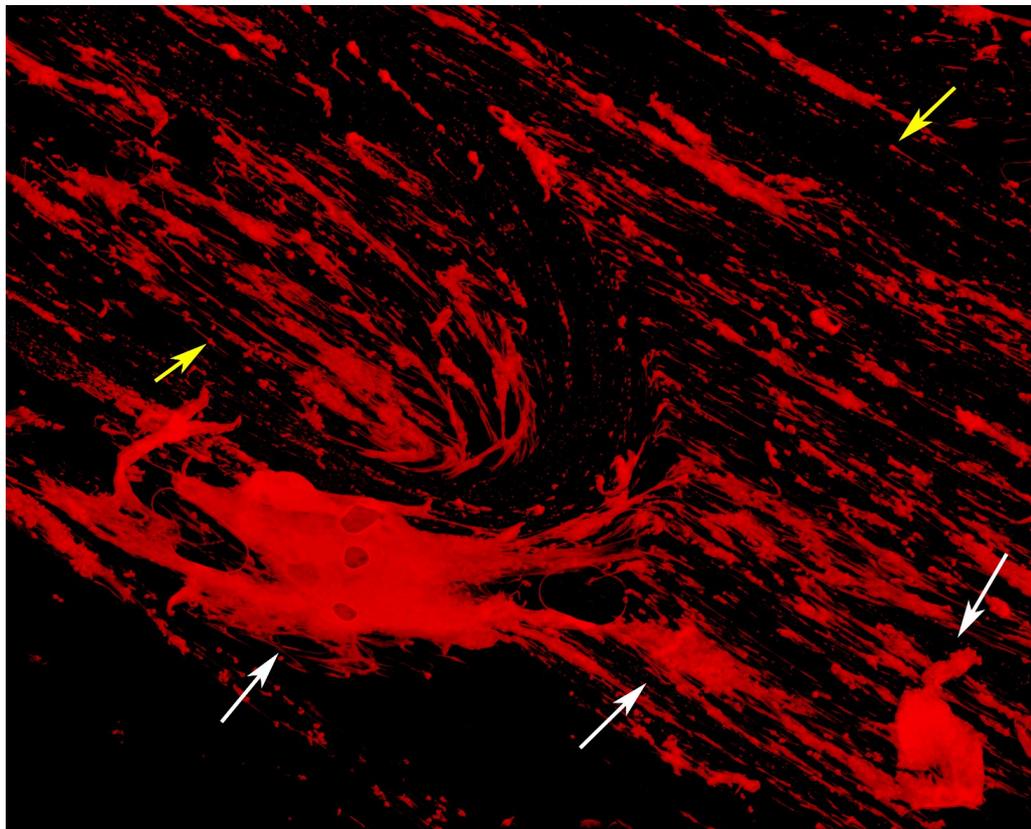


Рис. 1.3. Цитологічний відбиток з поверхні епітелію в ділянці запалення, зафарбовування пропідій йодидом, за матеріалами [44]. Нейтрофіли, що починають викидати нитки ДНК, позначені жовтими стрілками, так і агреговані НПП – білими стрілками

Пасивація великих, сторонніх чи токсичних об'єктів, безперечно, є корисною для організму, тож самопожертва нейтрофілів не є марною. Проте така масова смерть несе нові виклики для імунної системи. Зазвичай НПП вивільняються на відносно невеликих ділянках, і згодом вони повинні бути зруйновані ДНКазою-1 та ДНКазою-1L3 [45, 46] та врешті поглинуті фагоцитами, забезпечуючи баланс між утворенням НПП та їхнім «імунологічно мовчазним» усуненням.

Утворення НПП та продукція АФК є двома взаємопов'язаними процесами – адже висока кількість АФК стимулює утворення НПП, а утворення НПП призводить до утворення вільнорадикальних сполук. Окрім цього, дія

нейтрофільних ензимів, вивільнених при формуванні НПП, також може впливати на оточуюче тканинне середовище. Тобто, ділянки утворених НПП повинні бути ефективно очищені від утворених неоантигенів макрофагальною системою. Тоді утворення НПП матиме протизапальний, захисний характер. НПП були виявлені як один із захисних механізмів притаманний нейтрофілам (поряд з фагоцитозом, окисним вибухом та дегрануляцією), тож перші дослідження здебільшого стверджували їх позитивну роль в організмі. Одним з перших повідомлень про можливий негативний вплив НПП було виявлення антинейтрофільних цитоплазматичних антитіл (ANCA) в сироватці хворих на ANCA-асоційований васкуліт, які направлені специфічно проти компонентів НПП [47]. Згодом утворення НПП, повторне їх вивільнення чи неповне усунення, що призводить до цитотоксичних, прозапальних та протромботичних подій, було пов'язане з численними аутоімунними захворюваннями/неінфекційними захворюваннями (наприклад, ревматоїдним артритом, вовчаком, псоріазом), а також інфекційними станами, такими як сепсис [48, 49]. Оскільки НПП здатні щільно взаємодіяти з тромбоцитами, постало питання щодо їх участі в тромботичних процесах [46]. Тому, нині основна увага в дослідженні НПП зосереджена на їх залученні до патологічних подій.

Останні дослідження також показали шкідливий вплив НПП на ділянки, віддалені від місць їх утворення. Наприклад, оклюзію протоки підшлункової залози [50] та судин [51], адже, як бачимо з рис. 1.3, агреговані позаклітинні пастки є щільними макроскопічними структурами. В крові людини було виявлено низку ензимів-ДНКаз, які комплементують одна одну у забезпеченні ефективного усунення утворених циркулюючих НПП в кровотоці. Водночас у тварин, – подвійних нокаутів, – за зазначеними ензимами спостерігали утворення НПП-індукованих тромбів, що виражалось у поліорганній недостатності та смерті [46]. Подібні процеси відбуваються і при гострому запаленні, спричиненому сепсисом [46], та, як показали останні дані, – COVID [52, 53].

За умов хронічних запальних процесів, хронічному перевантаженні макрофагальної системи чи її неадекватності відбувається порушення видалення

утворених НПП. Як наслідок, організм зіштовхнеться із великою кількістю окиснених, а отже імунологічно «нових» епітопів. Це і є першопричиною утворення автоантитіл до гістонів, ДНК, цитоплазматичних компонентів нейтрофілів (ANCA) [54], що є характерними ознаками таких захворювань як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, та інші.

Більш того, зважаючи на виявлений факт індукції НПП гідрофобними НЧ [4] та, зокрема, нанокристаллами холестерину [13], в даній роботі ми звернули також увагу на можливість участі НПП в патології печінки, при якій ендogenous тригери спричиняють хронічний запальний процес, а також дослідили здатність утворених НПП впливати на циркулюючі молекули при хронічних захворюваннях з тривалим перебігом.

1.2. Участь нейтрофільних позаклітинних пасток в іммобілізації мікрооб'єктів

Забруднювачі навколишнього середовища у вигляді нано- та мікрочастинок (НЧ/МЧ), як сажа, азбест, цемент, смог, нові штучні матеріали (мікропластики, полімери), природні кристали (оксалати, холестерин) або ті, що утворюються під час метаболізму чи захисту (урат натрію при подагрі, гемозоїн при малярії, циркулюючі імунні комплекси при запаленні) постійно переповнюють людський організм. Контакт з НЧ/МЧ впливає на нашу імунну систему. Адже, фагоцитоз, екскреція, катаболізм, ізоляція та іммобілізація – це стратегії, за допомогою яких організм може захиститися або в ідеалі знищити гетерогенні НЧ/МЧ. В умовах, коли через хімічну інертність поглинені НЧ/МЧ не можуть бути перетравлені, окислені, розчинені або виведені, а також за відсутності специфічних рецепторів чи інших причин, наш організм вибере стратегію секвестрації – ізоляції потенційно шкідливих частинок в одному місці та обмеження їх подальшого контакту з тканинами [4]. НПП будуть задіяні в секвестрації і спричинятимуть утворення в'язких, липких заряджених макрооб'єктів, здатних закупорити протоки, судини та утворювати гранульоми в м'яких тканинах.

Опубліковані дані свідчать про те, що властивості поверхні та хімічний склад частинок істотно впливають на їх взаємодію з тканинами. На основі розрахунків [55] та експериментальних даних з наноалмазами різної величини [4, 56] було показано, що ліпофільні частинки розміром від 7 до 40 нм спричиняють «протікання» плазматичної мембрани. У нейтрофілах, що спеціалізуються на іммобілізації та деградації твердих часток, поглинання гідрофобних НЧ/МЧ та пов'язаний із цим лізосомальний витік, активують подальші молекулярні каскади, що призводять до утворення АФК та ініціації формування НПП. Ми продемонстрували, що при гострому запаленні нирок за дії кристалів оксалату виникає кристалізований некроптоз, пов'язаний з переходом проникності мітохондрій, їх набряком та утворенням ще більших кількостей АФК внаслідок аутокаталітичного процесу [57].

Нещодавно було показано, що НПП формуються в місці введення вакцини з ад'ювантом на основі оксиду алюмінію і є необхідними для забезпечення імунної відповіді [58]. Знаючи, що НПП утворюються в місцях вакцинації ми використали модифікації сполук алюмінію, зокрема, нановолокна оксиду алюмінію (який є імунологічно інертним у формі порошку), з метою посилення імунної відповіді шляхом селективної індукції НПП [59].

А пандемія коронавірусу, де НПП відіграють роль основного патогенетичного чинника загибелі людей від ускладнення коронавірусної хвороби, створює нагальну потребу глибокого вивчення даного процесу, наприклад розпочаті нещодавно клінічні дослідження анти-НПП препаратів при COVID-19 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04541979>).

1.3. Патології шлунково-кишкового тракту, в яких задіяні НПП

1.3.1. Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП). Неалкогольний жировий гепатоз або НАЖХП, англ. non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), є найчастішим варіантом хронічних захворювань печінки, зустрічається в 25 % людей з тенденцією до зростання, особливо в розвинутих країнах, а саме США і

країнах Європи [60]. Як самостійна нозологічна одиниця НАЖХП було відкрито лише в 1980 р., після підтвердження того, що захворювання печінки може розвиватись і в людей, які не споживають алкоголь [61]. Проте і досі залишається недослідженим, що НАЖХП може проходити безсимптомно і в третині випадків призводить до неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ), який, у свою чергу, у 20 % випадків може загострюватись до цирозу печінки. НАЖХП може посилювати розвиток діабету 2 типу, серцево-судинних захворювань та хронічної ниркової недостатності [62].

При НАЖХП гепатоцити акумулюють надлишок жиру, процес відомий як стеатоз. Цей жир може надходити із їжею, утворюватись печінкою чи вивільнятись інсулін-резистентною білою жировою тканиною (адипоцитами). Дана стадія є зворотною (до нормального стану), і за останніми оцінками вражає до 25 % популяції США або 75 мільйонів людей [63]. Основним критерієм оцінки НАЖХП є печінкова біопсія, а відсутність надійних маркерів в крові робить даний стан важко діагностованим [60].

Якщо накопичений жир спричиняє стрес та ушкодження гепатоцитів, то розвивається НАСГ, англ. non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Переповнені жиром гепатоцити і далі набухають та починають відмирати (здебільшого шляхом некрозу), спричиняючи запалення. Утворюється щільна сполучна тканина (відбувається рубцювання) і колагенові волокна поступово замінюються мертвими клітинами. Стан є зворотнім і може перетворюватись назад до НАЖХП. У близько 30 % людей з НАЖХП розвивається НАСГ [63].

Через роки чи десятиліття, відмирання гепатоцитів призводить до прогресивного накопичення рубцевої тканини, яка робить печінку більш жорсткою та порушує її функцію. Цей стан відомий як цироз, він призводить до відмови печінки, раку печінки; добре діагностується за допомогою ультразвуку. У близько 20 % з НАСГ розвивається цироз печінки [64]; цироз є незворотнім процесом. Співвідношення між описаними патологічними станами підсумовано на рис. 1.4.

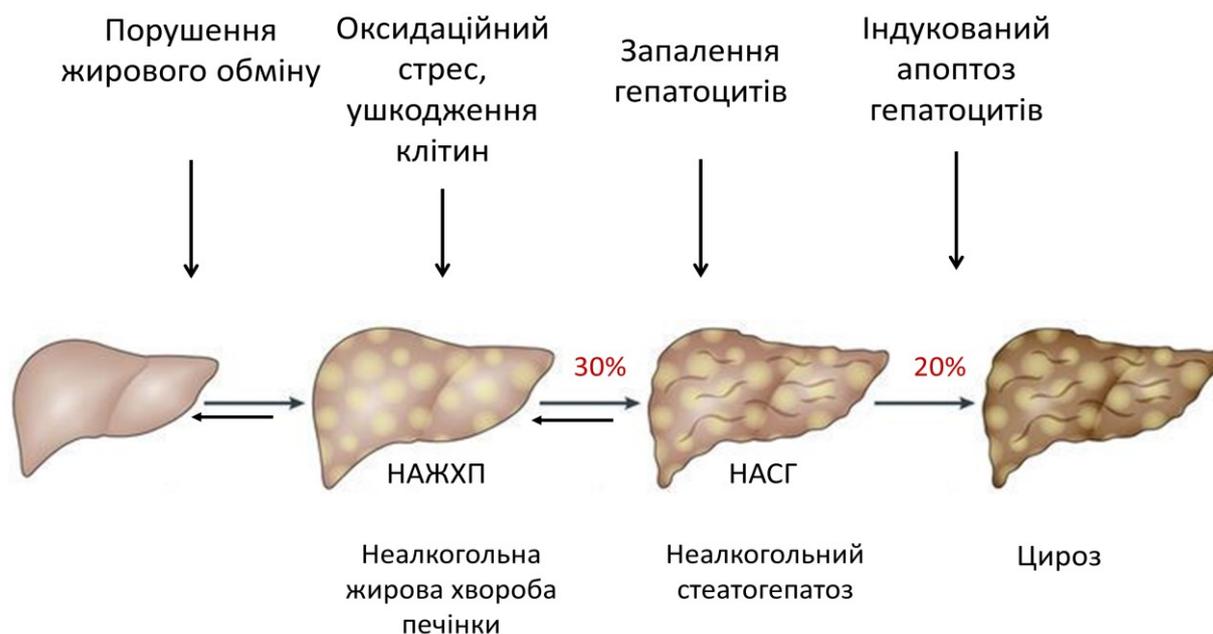


Рис. 1.4. Зв'язок різних патологічних станів печінки між собою

Такі чинники як: порушення жирового обміну, оксидативний стрес та пошкодження клітин, запалення гепатоцитів, індукований апоптоз та некроз гепатоцитів можуть впливати на кожну стадію і посилювати патологічні прояви та прискорювати перехід до наступної стадії. Червоним кольором показано відсоток людей, які зазнають переходу на важчу патологічну стадію.

Ожиріння є серйозним фактором ризику при розвитку НАЖХП, але сприйнятність до НАЖХП значно змінюється між окремими людьми, частково внаслідок генетичного поліморфізму [65].

У 2017 році Stender та колеги [66] використали дані 2 675 пацієнтів, яким здійснили магнітно-резонансну спектроскопію для визначення вмісту печінкових тригліцеридів та генотипування на виявлення одно-нуклеотидних поліморфізмів (SNP) для виявлення генетичних факторів НАЖХП. Вони виявили асоціацію поліморфізму в гені «patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) rs738409 'M variant' (43928847C>G)» та НАЖХП. Таким чином PNPLA3 може вважатись першим відомим генетичним фактором, що визначає схильність до НАЖХП. Розподіл даної алелі, а також поширеність НАЖХП в світі представлено на рис. 1.5 (за даними [67]). Представлені дані знайшли своє підтвердження в роботах, опублікованих у 2018 році [68].

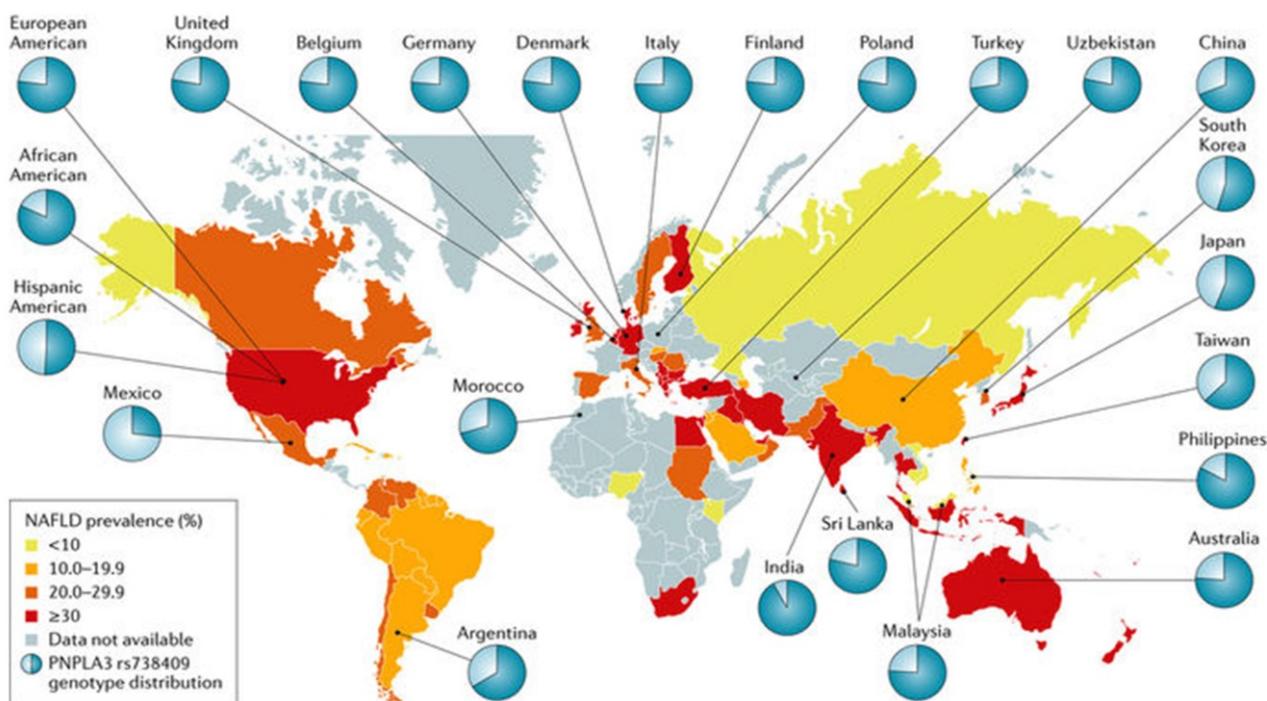


Рис. 1.5. Поширення генетичного варіанту гену PNPLA3 та частота НАЖХП у різних країнах світу

Проблемою вивчення патології НАЖХП є те, що на даний час немає ідеальної тваринної моделі, що була б схожою до ключових критеріїв організму людини. Саме тому сьогодні як ніколи є актуальними дослідження пошуку достовірного аналогу цього патологічного процесу. Згідно з останніми даними (публікацією журналу Nature Medicine, 2017 [69]), на даний час немає єдиної ідеальної тваринної моделі неалкогольного жирового гепатозу, яку можна використати для дослідження перебігу та пошуку лікування. Тому потрібно змінювати і вдосконалювати вже існуючі моделі.

1.3.2. Природні мікрочастинки у шлунково-кишковому тракті. Жовчні камені є основним шлунково-кишковим захворюванням, близько 100 мільйонів уражених людей (1,6 % населення планети) у 2013 році та понад 100 000 смертей у 2015 році [70]. Жовчні камені індукують холецистит, локальну перфорацію і летальний перитоніт чи жовчний панкреатит. Фізіологічно жовч концентрується та ацидифікується епітелієм жовчних проток і міхура. Цей процес збільшує

розчинність холестеролу та кальцію і зменшує ризик утворення жовчних каменів. Сьогодні літогенез жовчних каменів розглядається як результат перенасичення розчинів кальцієвими солями [71] та холестеролом [12] та включає утворення фактору ініціації [72], хоч останній і досі залишається невідомим.

Утворення жовчних каменів призводить до оклюзії жовчних проток (холестази) та наступного ушкодження гепатоцитів [73] і розвитку запальних процесів в печінці [74], вказуючи на прямий зв'язок дії жовчних кислот та розвиток ушкодження печінки [75].

Жовчні камені в основному утворені з холестеролу, жовчних кислот і відкладень кальцію, можуть легко досягати кількох сантиметрів у діаметрі. Кристали холестеролу поширені в організмі людини, можуть спонтанно та фізіологічно з'являтися у просвітах жовчного міхура [12]. З іншого боку, нейтрофіли патрулюють жовчні протоки, оскільки вони з'єднують печінку з кишечником. Кишечник наповнений бактеріями (деякі тварини навіть не мають жовчних проток і виділяють жовч безпосередньо в кишечник) і жовчні протоки не повинні стати шляхом поширення бактерій – це контролюють нейтрофіли. Кристали холестеролу в просвітах жовчного міхура можуть активувати нейтрофіли та ініціювати утворення НПП, а від так призвести до їх агрегації та формування каменів [11]. Гідрофобні кристали холестеролу можуть розчиняти мембрану клітин [13] і, як ми припускаємо, – ушкоджувати тканини печінки. Сечова кислота є одним з основних побічних продуктів катаболізму людини, а також сильним антиоксидантом. Вона добре розчиняється в клітинах, але при контакті з позаклітинним середовищем, із високим вмістом натрію (через загибель клітин, розрив мембран тощо), формуються кристали урату натрію, що мають меншу розчинність і тенденцію до кристалізації у формі голок [76] та є основною причиною подагри. Нейтрофіли безпосередньо поглинають кристали урату натрію та ініціюють утворення НПП, а відтак – запальну відповідь [77]. Було показано, що після ізоляції кристалів урату всередині агрегованих НПП розпочинається процес зупинки запальної реакції, таким чином роблячи подагру самообмежуючою патологією [25].

1.3.3. Роль фруктози в патології у розвитку запальних процесів. Фруктоза відіграє особливу роль у розвитку патологій гепатобіліарної системи [78], і відносно недавно названа як причина НАЖХП [79]. Фруктоза – простий цукор, який міститься у фруктах і меді, але також є основним компонентом двох найбільш часто використовуваних підсолоджувачів: сахарози (столовий цукор, дисахарид фруктози та глюкози) і кукурудзяного сиропу з високим вмістом фруктози (суміш моносахаридів фруктози та глюкози). Споживання фруктози помітно зросло протягом останніх сотень років паралельно із ростом споживання сахарози та кукурудзяного сиропу з високим вмістом фруктози. В даний час у «західній дієті» вживання доданих цукрів наближається до 15 % отриманої людиною загальної енергії. Дійсно, до 1960-х років численні праці повідомляли, що фруктоза відрізняється від глюкози завдяки своїй унікальній здатності підвищувати як тригліцериди в плазмі, так і жир у печінці [80–82]. Метаболічні дослідження, в яких використовувалась радіоізотопно-мічена фруктоза, показали у два-три рази більшу інтенсивність включення мітки в тригліцериди плазми та печінки, ніж це спостерігалось за дії глюкози [83]. Однак загальна кількість фруктози, яка перетворюється на тригліцериди була відносно невеликою (від 1 до 3 % від усієї спожитої фруктози), що не спричиняло значного впливу на ліпогенну відповідь організму [84]. Ключовою знахідкою є те, що сама по собі молекула фруктози не є головним чином відповідальною за утворення тригліцеридів, а натомість жири накопичуються в печінці внаслідок загальної активації ліпогенезу та блокування окиснення жирних кислот за надмірної кількості фруктози [85, 86]. Показано, що фруктоза також стимулює синтез тригліцеридів через шлях деградації пуринів, який запускається внаслідок швидкого фосфорилування фруктози фруктокіназою. Утворена АТФ вступає в шлях деградації пуринів через активацію АМФ-деамінази, призводячи до утворення сечової кислоти та мітохондріальних оксидантів. Мітохондріальний окисний стрес призводить до інгібування аконітази в циклі Кребса, як наслідок накопичується цитрат та стимулюється АТФ цитрат ліаза та синтаза жирних кислот, призводячи до ліпогенезу *de novo* [9]. Інші ушкоджуючі шляхи дії фруктози детально описані в огляді [78]. В печінці фруктозу метаболізує ензим фруктокіназа С, яка діє швидко і не має механізму зворотнього зв'язку, що

при споживанні достатньої кількості фруктози, скажімо в солодких напоях, призведе до миттєвого падіння рівня АТФ в клітинах [87, 88]. Водночас, внаслідок описаного шляху, рівень сечової кислоти в печінці зростає [86]. Позбавлені енергії (АТФ виснажений) гепатоцити схильні до загибелі і при порушенні їх цілісності внаслідок хронічної загибелі та перевантаження макрофагальної системи ми припускаємо утворення вторинно некротичних клітин. Це означає, що високий вміст сечової кислоти попаде в міжклітинний простір. Висока концентрація іонів Na у позаклітинному просторі призведе до утворення моноурату натрію. Розчинність останнього в 17 разів менша (0,068 мг/мл), ніж в сечової кислоти (1,20 мг/мл), відповідно моноурат натрію випадає в осад. Утворені кристали моноурату натрію мають характерну форму голок і є не лише давно відомими індукторами подагри, а й як показано нещодавно – потужними індукторами утворення НПП [89, 90]. Саме НПП беруть участь у пасивації кристалів моноурату натрію та забезпечують зниження імунної відповіді внаслідок дії ензимів НПП [25].

Природними джерелами фруктози є фрукти, а також мед. У раціоні людини ці продукти становили мізерну частку за часів кочівників-збирачів, трохи більшу при переході до землеробства, тож не дивно, що у фруктокінази С у печінці не виробився механізм зворотнього негативного зв'язку, – адже еволюційно люди ніколи не стикались із ситуацією надлишку фруктози в раціоні. Аж доки промислова революція та економічна вигода не запропонували дуже дешеве джерело, – підсолоджувачі – кукурудзяний сироп, який складається близько 50 % з фруктози. Водночас мода на солодкі напої додатково стимулює споживання підсолоджувачів і мало хто задумається, що в 1 літрі солодких газованих напоїв, в залежності від їх типу і країни, міститься до 150 г цукру, в середньому – 100 г [91]. Про зв'язок фруктози у дієті та подагри добре відомо з результатів клінічних досліджень [92]. Надмірне споживання солодких напоїв та його очевидний зв'язок з НАЖХП призвели навіть до введення 20 % податку на солодкі напої в деяких країнах. Водночас, можлива участь НПП в даному процесі, а, отже – можливість впливати на нього, залишались не дослідженими. Тому в даній роботі ми вирішили перевірити роль НПП в активації ушкоджень печінки за дії кристалів моноурату натрію, утворених під впливом фруктози.

1.3.4. Можлива участь позаклітинних нейтрофільних пасток у запальних процесах шлунково-кишкового тракту. Під час проведення досліджень із ВЛВХД та аналізуючи дані літератури ми висунули гіпотезу про тісний зв'язок між виникненням НАСГ та активацією нейтрофілів шляхом формування НПП на підставі наступних фактів:

1. Нейтрофіли патрулюють тканини тіла та поверхні органів [50]. Проте в місцях поблизу великої концентрації бактерій, як от кишківник, кількість нейтрофілів може бути значною. Нещодавно було описано, що трансгенні миші IL-17 демонструють підвищену проникність нейтрофілів у протоки підшлункової залози, утворення та агрегацію НПП за дії бікарбонату, і як наслідок, оклюзія підшлункових проток і панкреатит [50] (рис. 1.6). Співвідношення вмісту бікарбонату/ CO_2 і рівня рН є критичними факторами, що впливають на формування НПП [50].

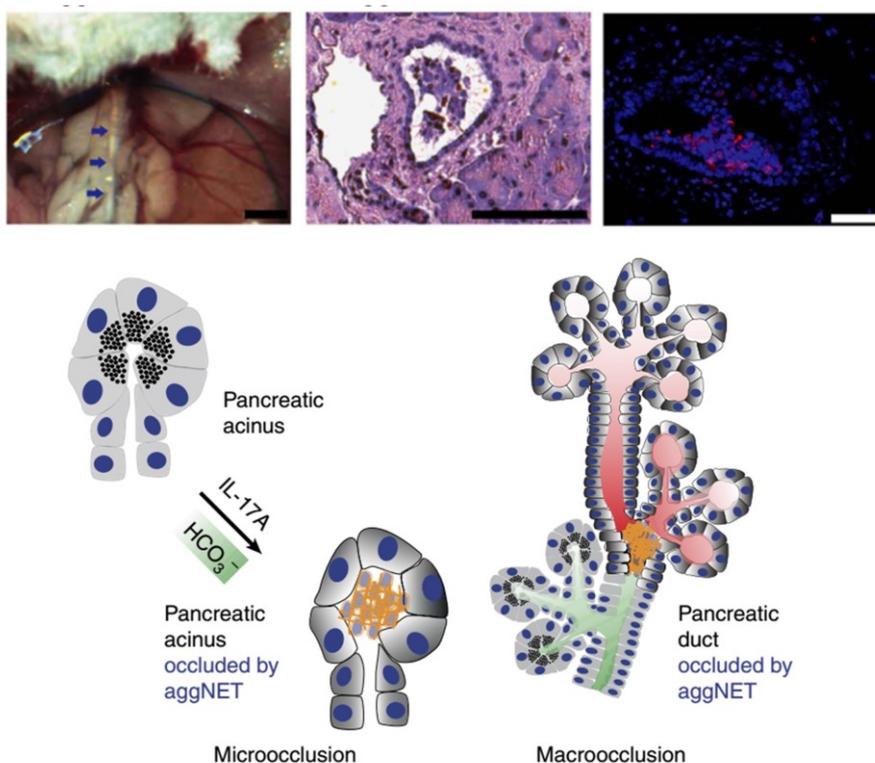


Рис. 1.6. Нейтрофільні позаклітинні пастки здатні закупорювати протоки підшлункової залози. Верхній ряд – макроскопічна фотографія, препарат зафарбований гематоксилін-еозином та імуногістохімічний аналіз на виявлення мієлопероксидази (червона) та ДНК (синя). Нижній ряд – схематична інтерпретація процесу авторами роботи. За матеріалами роботи [50]

2. Взаємодія малих гідрофобних НЧ з плазматичною мембраною призводить до специфічного пошкодження оболонки, що в нейтрофілах активує формування НПП [50], це було показано і для нанокристалів холестерину [13] (рис. 1.7) і відбувалося навіть в умовах стерильних запальних процесів [50].

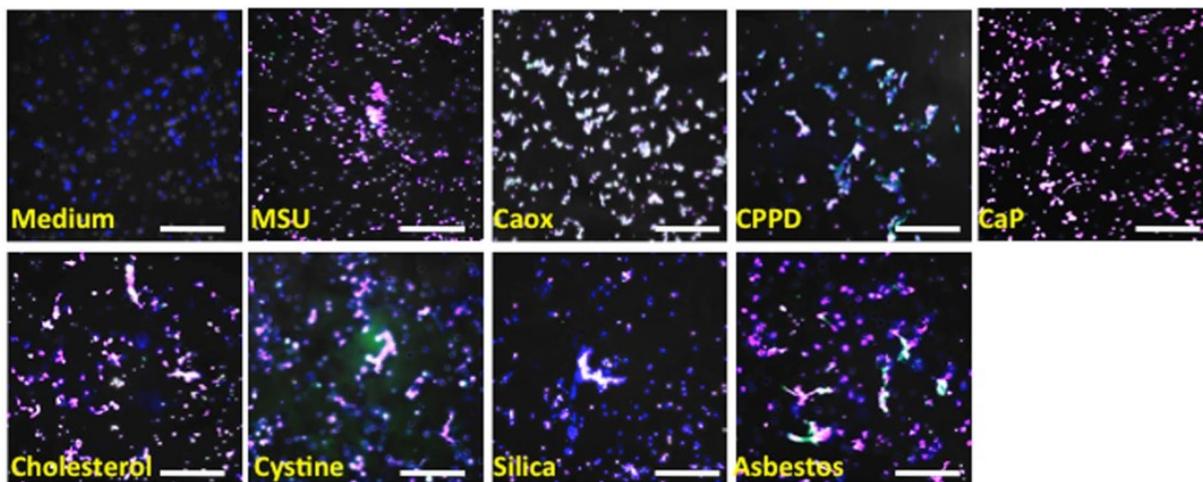


Рис. 1.7. Нейтрофіли утворюють НПП при контакті з кристалами моноурату натрію (MSU), оксиду кальцію, фосфату кальцію, холестерину, цистину, кремнію, азбесту. ДНК зафарбована синім, цитрулінований гістон H3 – червоним, нейтрофільна еластаза – зеленим. За матеріалами роботи [13].

Не варто недооцінювати здатність НПП до формування бар'єрів: вони захоплюють та іммобілізують збудники такі, як бактерії, а також частинки, які не можуть бути виведені з організму. Прикладами перших можуть бути природні кристали урату натрію, утворені під час подагри [50] або штучні НЧ, з якими тіло контактує, але не може ні розкласти, ні видалити (наприклад, нанодіаманти або НЧ полістиролу) [50] або нанокристали холестерину [13], які знаходяться в жовчі. Під час деяких гострих запальних процесів, що включають внутрішні органи, такі як гострий некротичний панкреатит, виникає масивний некроз тканин, організований як псевдокисти підшлункової залози [50], на відміну від звичайних кист, ці псевдокисти не оточені епітеліальними шарами. В цій роботі вчені дослідили зразки аутопсійного матеріалу внутрішніх органів пацієнтів з гострим запаленням органів черевної порожнини і виявили ділянки інтерфейсу між інтактними та некротизованими тканинами. Імуногістохімічний аналіз показав, що некротичні ділянки, що спостерігаються при некротичному панкреатиті та перитоніті, є

ізолювані від навколишніх здорових тканин агрегованими НПП. Конденсований шар агрегованих НПП таким чином, просторово захищає і відмежовує ділянку некрозу, тим самим обмежуючи поширення некроз-асоційованих прозапальних медіаторів у глиб органу [50].

Спричинені агрегованими НПП, камені в жовчних протоках призводять до накопичення жовчі, яка згубно діє на гепатоцити та спричиняє НАЖХП. Запобігши агрегації НПП можна запобігти переродженню тканин печінки за дієт із високим вмістом холестерину та фруктози через вплив на мікрокристали моноурату натрію [25, 78].

Таким чином, відповідно до сучасних уявлень, роль НПП є двоякою. З одного боку, НПП є корисними для організму, адже відповідають за захоплення, знищення чи/та пасивацію бактерій, грибів, інших великих патогенів чи інертного матеріалу. Також відмежовують ділянки некрозу та рани для унеможливлення поширення запалення. Але з іншого боку, НПП можуть негативно впливати на організм. Зокрема, неефективне усунення НПП призводить до розвитку запалення та продукування аутоантитіл. Також НПП здатні закупорювати судини та протоки за гострих запальних реакцій, а цитокіновий вибух, який вони спричиняють, здатний тимчасово активувати імунну систему, а будучи неконтрольованим – переростати в «цитокіновий шторм». На сьогодні створено декілька ефективних фармакологічних сполук, здатних впливати на утворення НПП [93–95]. Це відкриває перспективи до розробки шляхів контролю за утворенням НПП в організмі.

Зважаючи на наявний рівень знань, мета дисертаційної роботи була визначена як: 1) дослідження впливу природних НЧ, утворених в гепатобіліарній системі, таких як НЧ холестерину та моноурату натрію на процеси утворення НПП та розвитку системної запальної відповіді, та вивченні можливостей запобігання ушкодженню тканин печінки шляхом використання інгібіторів утворення НПП; 2) дослідження впливу НПП на модифікацію циркулюючих молекул при хронічній запальній відповіді; 3) дослідження можливості локалізованого використання активаторів НПП у формі НЧ з метою індукції контрольованої імунної реакції на введений антиген, тобто використанні НЧ-індукторів НПП як ад'ювантів вакцин.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Серії досліджень

Згідно поставлених завдань дисертаційної роботи було проведено 14 серій досліджень, зокрема на першому етапі проведено 9 серій досліджень для з'ясування ролі ендогенних НЧ в індукції формування НПП (табл. 2.1); на другому етапі – 5 серій досліджень для з'ясування ролі екзогенних НЧ в індукції НПП (табл. 2.1).

В 1-й серії досліджень було досліджено вплив ВЛВХД на різні лінії мишей, зокрема Balb/c, C57BL6/J, C57BL6/N.

У 2-й серії було визначено динаміку ушкоджень тканин печінки та супутніх системних запальних реакцій за дії ВЛВХД у мишей C57BL6/N упродовж 8 тижнів з двотижневим інтервалом оцінки.

У 3-й серії досліджень оцінено ушкоджуючий вплив ВФД та досліджено дію метопрололу на можливість його модулювання.

У 4-й серії досліджено роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку запальних реакцій за умов ВЛВХД шляхом ін'єкції анти-нейтрофільних антитіл.

В 5-й серії досліджень протестовано низку інгібіторів формування НПП на різних етапах, використовуючи інгібітори екстравазії нейтрофілів (метопролол), агрегації НПП (гепарин), іммобілізації нейтрофілів з кісткового мозку (gCSF) у моделях ВЛВХД та ВФД.

У 6-й серії експериментів здійснено перевірку отриманих результатів 5-ї серії щодо дії гепарину.

У 7-й серії досліджено особливості ушкодження печінки у щурів, як тварин, у яких відсутній жовчний міхур.

У 8-й серії експериментів здійснено дослідження ушкодження гепатобіліарної системи та активації еластази нейтрофілів *in vivo*, використовуючи методи прижиттєвої детекції інфрачервоних зондів у тілі тварин.

У 9-й серії експериментів виявлено вплив високого вмісту іонів натрію в раціоні на участь нейтрофільних гранулоцитів у модульованні системних запальних процесів (на моделі індукованого артриту).

У 10-й серії експериментів досліджено утворення НППІ в моделі повітряної кишені за дії різних НЧ штучного походження.

В 11-й серії експериментів відслідковували долю флуоресцентних кон'югатів нанодіамантів після їх введення в тіло тварин.

В 12-й серії експериментів досліджено імунну відповідь мишей за імунізації коронавірусним пептидом кон'югованим з нанодіамантами.

В 13-й серії експериментів здійснено довготривалий моніторинг імунної відповіді мишей та локалізації нанодіамантів у тканинах після імунізації тварин.

У 14-й серії експериментів досліджено імунну відповідь у лабораторних кролів за імунізації нанодіамантами із коронавірусними пептидами.

Використані кількості тварин, дози агентів та інші деталі експериментів вказано в таблицях 2.1 та 2.2. Планування дослідів здійснювали згідно з принципом 3R щодо зменшення використання лабораторних тварин та принципів гуманного поводження з ними [96].

Групи тварин та серії досліджень ролі ендогенних наночастинок в індукції НПП

Серії досліджень	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Досліджувані групи	Вплив ВЛВХД на різні лінії тварин	Вплив ВЛВХД на динаміку ушкодження печінки у мишей C57BL6/N	Вплив ВЛВХД та ВФД на морфологічні та фізіологічні показники мишей C57BL6/N	Роль нейтрофілів у патологіях за ВЛВХД у мишей C57BL6/N	Вплив ВЛВХД та ВФД та інгібіторів нейтрофільних гранулоцитів на морфологічні та фізіологічні показники мишей C57BL6/N	Вплив ВЛВХД та ВФД та інгібітора агрегації НПП на морфологічні та фізіологічні показники мишей C57BL6/N	Особливості високохолестеринової дієти у щурів Wistar	Дослідження патологічних змін при ВЛВХД <i>in vivo</i> в мишей C57BL6/N	Дослідження впливу високосольової дієти на розвиток запальних процесів в мишей C57BL6/J
	Balb/c	СД	СД	СД	СД	СД	СД	СД	СД
	ВЛВХД, n=12 C57BL6/J	N=5 ВЛВХД	N=5 ВЛВХД	N=5 ВЛВХД	N=9 ВЛВХД	N=8 ВЛВХД	N=10 ВХД	N=8 ВЛВХД	N=5 СД-РА
	ВЛВХД, n=12 C57BL6/N	N=5, 2 тижні ВЛВХД	N=5 ВФД	N=5, анти-нейтр. АТ — 1A8, s.c., 500 мкг що 2 дні ВЛВХД+ізотипні АТ	N=6 ВЛВХД+МП	N=8 ВЛВХД+гепарин	N=5	N=6 ВФД	N=5 ВСД
	ВЛВХД, n=12	N=5, 3 тижні ВЛВХД	N=5 ССl ₄	N=10, ізотипні АТ — 2A3, s.c., 500 мкг що 2 дні	N=6, МП — per os, 50мг/200мл рідини ВЛВХД+гепарин	N=8, Гепарин — s.c., 100 МО/кг, щодня ВФД		N=6	N=5 ВСД-РА
		N=5, 4 тижні ВЛВХД	N=5, 30мг/мишу, інгаляція, 2x /тиждень ВЛВХД+МП		N=6, гепарин — s.c., 100 МО/кг, щодня ВЛВХД+gCSF	N=12 ВФД			N=5
		N=5, 6 тижнів ВЛВХД	N=5, МП — per os, 50мг/200мл рідини ВФД+МП		N=6, gCSF — s.c., 1,0 МО/кг, що 3 дні ВФД	N=8, гепарин — s.c., 100 МО/кг, щодня			
		N=5, 8 тижнів ВЛВХД	N=5, МП — per os, 50мг/200мл рідини		N=12 ВФД+МП				
					N=6, МП — per os, 50мг/200мл рідини ВФД+гепарин				
					N=6, Гепарин — s.c., 100 МО/кг, щодня ВФД+gCSF				
				N=6, gCSF — s.c., 1,0 МО/кг, що 3 дні ССl ₄					
				N=6, 30мг/мишу, інгаляція, 2x /тиждень					

ВЛВХД — корм Altromin C1089, >15% ліпідів, 1 % холестерину і 0,5% холевой кислоти

ВФД — 10% фруктози у воді

ВХД — їжа виключно на основі тваринних ліпідів

ВСД — корм ssniff Spezialdiäten GmbH, E15431-34 з 4% NaCl в гранулах + 0,9% NaCl у воді

РА — ревматоїдний артрит внаслідок трансферу сироватки артритної трансгенної миші лінії K/BxN

МП — метопролол

gCSF — гранулоцит колонієстимулюючий фактор

The 3 R's of Animal Research

Reduce



Reduce the number of animals used

Refine



Refine tests to cause animals less stress

Replace



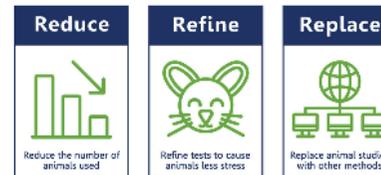
Replace animal studies with other methods

Групи тварин та серії досліджень ролі екзогенних наночастинок в індукції НПП

Серії досліджень	10	11	12	13	14
Досліджувані групи	Утворення НПП в повітряній кишці за дії різних наночастинок у мишей лінії Balb/c	Локалізація нанодіамантів <i>in vivo</i> після введення в організм мишей	Імунна відповідь на дію нанодіамантів і коронавірусних пептидів у мишей Balb/c	Довготривала імунна відповідь на дію нанодіамантів і коронавірусних пептидів у мишей Balb/c	Імунна відповідь на дію нанодіамантів і коронавірусних пептидів у лабораторних кролів
	Контроль	Нанодіаманти	Контроль — лише пептид	Нанодіаманти	Контроль — CFA/IFA+IVIG
	N=5	N=3 NSW, 5 днів	N=12	N=10, 365 днів	N=4
	Графен оксид		Нанодіаманти — пептид		Нанодіаманти — пептид
	N=5		N=12		N=8
Al ₂ O ₃ HB					
N=5					
Al(OH) ₃					
N=5					

Дизайн експериментів
Здійснено відповідно до
Принципів 3R

The 3 R's of Animal Research



2.2. Об'єкт дослідження

2.2.1. Умови проведення дослідів. Дослідження проводили на мишах ліній C57BL6/N, C57BL6/J, Balb/C, щурах Wistar та кролях. Експерименти здійснювались згідно національних «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1985). Тварин утримували у віварії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, в умовах постійної температури 21,5°C, контрольованої вологості, освітлення та кондиціонування повітря.

В експериментах визначали: масу тіла тварин, формування імунної відповіді, поведінкові реакції, біохімічні показники крові та сечі, патогістологічні зміни печінки та жовчного міхура за умов утворення НПП при стимулюванні ендогенними та екзогенними НЧ, здатність модифікувати прозапальний вплив нейтрофільних гранулоцитів та утворених НПП.

2.2.2. Забір біологічного матеріалу для дослідження. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до рішення комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН, протокол № 90 від 15.07.2020 р. та біоетичної комісії ЛНМУ ім. Данила Галицького (протоколи 20170223/5, 20180226/2, 20191216/10, 20201221/9).

Кров здорових донорів отримували шляхом забору стерильними вакуумованими системами 20 мл периферичної венозної крові, після отримання добровільної інформованої згоди донора на забір біоматеріалу.

2.3. Тваринні моделі, використані у дослідженнях

2.3.1. Модель активації нейтрофілів у повітряній кишені.

Експериментальних тварин (мишей лінії Balb/c) було поділено на групи (у кожній $n = 5$). Повітряну кишеню формували шляхом ін'єкції 5 – 7 мл стерильного повітря підшкірно у ділянці спини мишей для утворення кишені, в яку згодом інфільтруються імунні клітини. Через два дні у сформовану кишеню додатково вводили 2 – 5 мл стерильного повітря. Ще через два дні, 4 мг досліджуваної сполуки у фізіологічному розчині або лише фізіологічний розчин (негативний контроль) вводили у повітряну кишеню миші. На наступний день тварин виводили з експерименту, досліджували клітинний вміст кишені та аналізували забрану шкіру. Для визначення клітинного вмісту повітряної кишені, в останню вводили 2 мл фізіологічного розчину і через одну хвилину відбирали його. Для осадження клітин, отриманий змив центрифугували 5 хв., 1200 об./хв та готували мазки для подальшого гістологічного дослідження. Для візуалізації клітин, їх забарвлювали розчином гематоксилін-еозину та аналізували за допомогою світлової мікроскопії. Тканину повітряної кишені забирали та відразу здійснювали мікрофотографування. Після цього отримані зразки витримувалися на повітрі до повного висихання та повторно аналізували [4].

2.3.2. Модель індукції імунної відповіді (клітинної та гуморальної) у лабораторних тварин. Модель визначення гуморальної та клітинної імунної відповіді вивчали на прикладі імунізації овальбуміном відповідно до [97] та модифікації згідно [4]. Мишам здійснювали внутрішньоочеревинну чи підшкірну імунізацію, що включала 50 мг ад'юванту та 10 мг антигену – овальбуміну. Ад'ювантом виступали гідроксид та/чи солі алюмінію, повний/неповний ад'ювант Фройнда чи інший широкоживаний ад'ювант. Як ад'ювант також використовували нанокompозити на основі модифікованих нанодіамантів, які ковалентно приєднані чи змішані з антигеном. Раціон тварин був стандартним, доступним *ad libitum*. Імунізацію тварин здійснювали двічі (у випадку ад'юванта

Фройнда перша імунізація з повним, а наступні – з неповним ад'ювантом), на 1 та 14 дні експерименту. До початку експерименту та перед кожною імунізацією тваринам проводили забір крові. Кров забирали із кінчика хвоста, до 200 мкл з наступним періодом відновлення (до наступного забору) – 3 дні. За потреби забір крові здійснювали з використанням анестезії – трибромоетанолу (Авертину) [97, 98] та за підтримання температури тварини за допомогою інфрачервоних обігрівачів. З отриманих зразків крові виділяли сироватку, в якій здійснювали подальше визначення вмісту специфічних та неспецифічних антитіл до досліджуваних антигенів. Через 28 – 35 днів після початку імунізації тваринам ініціювали реакцію гіперчутливості сповільненого типу (гіперчутливість IV типу). Для цього між 2 і 3 фалангами пальців ноги вводили 5 мкг антигену у 50 мкл фізіологічного розчину (одна лапка) або самого фізіологічного розчину (протилежна лапка). Визначали розмір лапки до і після введення, щодня, протягом кількох днів, поки розмір лапки не повернувся до вихідного. Тварин виводили з експерименту цервікальною дислокацією після загальної анестезії. Після виведення тварин з експерименту здійснювали забір зразків крові, внутрішніх органів, як от лімфатичних вузлів, селезінки тощо для проведення імуногістохімічних досліджень.

2.3.3. Модель неалкогольного стеатогепатиту в лабораторних мишей.

Для індукції НАСГ групу тварин утримували на ВЛВХД упродовж 2 тижнів (Altromin, C 1089). Контрольна група отримувала стандартний раціон (ПФ ВІТА, м. Обухів). До початку експерименту та ще два тижні здійснювали забір крові з кінчика хвоста, з крові виділяли сироватку. Після завершення експерименту здійснювали забір тканин печінки, з яких виготовляли гістологічні препарати (H&E) та здійснювали морфометричну оцінку площі гепатоцитів і вмісту в них ліпідів.

Експериментальних тварин, мишей лінії C57BL6/N у віці 8 тижнів і в діапазоні мас 20 – 22 г переводили на спеціальний раціон. Кожна група тварин, яка включала мінімум 5 особин, отримувала однаковий раціон. Досліджували наступні

групи: стандартний раціон (стандартний поліораціонний комбінований корм для лабораторний мишей ПК 120-3В та вода), ВЛВХД (стандартний модельний корм для високохолестеринових дієт С1089, Altromin, що містить 1 % холестеролу і 0,5 % холевої кислоти та вода), ВФД (стандартний повнораціонний комбінований корм для лабораторний мишей ПК 120-3В та 10%-ий розчин фруктози у воді). Експерименти повторювали двічі. Експеримент тривав 6 тижнів. Що три дні, під час зміни підстилки тварин, їх зважували на електронних терезах та занотовували вагу. До початку експерименту та потім, що два тижні, здійснювали забір венозної крові (з кінчика хвоста), з якої отримували сироватку, котру негайно заморожували. По завершенні досліду, тварин виводили з експерименту шляхом внутрішньом'язової ін'єкції трибромостанолу та наступної цервікальної дислокації. Проводили розтин тварин, при цьому здійснювали мікрофотографування органів тварин, зокрема печінки, жовчного міхура та ін.

2.3.4 Раціони тварин. Мишей лінії С57BL6/Н у віці 8 тижнів і в діапазоні мас 20 – 22 г переводили на спеціальний раціон. Корм та вода були доступні *ad libitum*.

Стандартна дієта. У стандартному раціоні комбінований корм для лабораторний мишей ПК 120-3, основні компоненти корму наведені в табл. 2.3. Даний корм є типовим кормом, що використовується для розведення нормальних лабораторних гризунів та забезпечує усі їх потреби в поживних речовинах, мікроелементах, вітамінах.

Високоліпідна високохолестеринова дієта. Використовували стандартний модельний корм для високохолестеринових дієт С1089, Altromin, що містив 1 % холестеролу та 0,5 % холевої кислоти. Детальний вміст компонентів корму наведено в додатку Б, загальний вміст жиру складав мінімум 15%.

Високосольова дієта. Використовували модельний корм ssniff Spezialdiäten GmbH, E15431-34 з 4 % NaCl в гранулах та додатково 0,9 % NaCl у воді.

Високохолестеринова дієта щурів. Тварин годували виключно холестерин-вмісною їжею (сало, смалець).

Склад поліораціонального гранульованого комбікорму для мишей ПК 120-3

№ п/п	Компоненти	% вмісту
1	Борошно пшеничне 2-го сорту	12,0
2	Борошно із пшеничних 2-го сорту панірувальних сухарів	13,0
3	Крупа вівсяна	38,0
4	Насіння соняшника	12,0
5	Просо	6,0
6	Молоко сухе знежирене	8,0
7	Борошно рибне	2,5
8	Дріжджі кормові, сухі	2,5
9	Меляса	4,2
10	Премікс	1,0
11	Кальцій вуглекислий	0,5
12	Натрій хлористий	0,3
Всього		100

2.4. Методи дослідження

У роботі використано фізіологічні та гістологічні методи, такі як вивчення поведінки та фізіологічного стану тварин, хімічний аналіз, методи забору та фіксації тканин, мікрофотографії, гістологічний аналіз, комп'ютерний аналіз гістологічних препаратів, а також статистичне опрацювання результатів дослідження.

2.4.1. Спостереження за поведінковою реакцією тварин. Що три дні, під час зміни підстилки тварин, їх зважували на електронних терезах та занотовували вагу.

Також під час прибирання кліток тварин визначали зміни фізіологічної поведінки. Тварин поміщали в прозорий прямокутний контейнер, позбавлений будь-яких укриттів та зверху закривали кришкою з вентиляційними отворами. Спостерігали за поведінкою тварин, визначали фізіологічні стани тварин [99]. Потім по кришці контейнера легенько постукували і визначали реакцію тварин на стрес. Усі процедури записували за допомогою швидкісної камери GoPro.

2.4.2. Основні біохімічні показники сечі тварин. Для визначення основних біохімічних показників сечі тварин використовували 10-ти параметричну смужкову тест-систему DUS 10 Test (DFI Co, Ltd, Корея). Дана система дозволяє неінвазивними методами оцінити основні показники при патологічних станах, що виявляються у сечі, як от:

1. лейкоцити – напівкількісно;
2. нітрит – якісно;
3. уробіліноген – напівкількісно;
4. білок – напівкількісно;
5. рН – напівкількісно;
6. кров (за вмістом еритроцитів) – напівкількісно;
7. питому густину – напівкількісно;
8. кетони – напівкількісно;
9. білірубін – якісно;
10. глюкозу – кількісно.

Зразок шкали зчитування результатів представлено на рис. 2.1. У зв'язку з обмеженістю матеріалів, краплі отриманої сечі наносили мікропіпеткою на досліджувані тест-смужки в такій послідовності: білок, лейкоцити, рН, білірубін, білірубіноген, інші.

Tests	Results / Resultats / Resultados / Ergebnisse						
Leukocytes/Leucocytes Leucocitos/Leukozyten	neg.	trace	+70	++125	+++500	WBC/ μ L	
Nitrite/Nitritos Nitrit	neg.	trace	pos.				
Urobilinogen/Urobilinogène Urobilinógeno	0.1	←Normal→ 1(16)		2(33)	4(66)	8(131) mg/dl (μmol/L)	
Protein/Protéines Proteínas	neg.	trace	+30(0.3)	++100(1.0)	+++300(3.0)	++++1000(10) mg/dl(g/L)	
pH	5	6	6.5	7	7.5	8	8.5
Blood/Sang Sangre/Blut	neg.	Hemolysis trace	+25	++80	+++200	Non Hemolysis+10	++80 RBC/ μ L
S.G/Densité Densidad/Spesz.Gew.	1.000	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
Ketones/Cétones Cetonas/Ketonkörper	neg.	±5(0.5)	+15(1.5)	++40(3.9)	+++80(8)	++++160(16)	mg/dl(mmol/L)
Bilirubin/Bilirubine Bilirrubina	neg.		+	++	+++		
Glucose/Glucosa	neg.	±100(5.5)	+250(14)	++500(28)	+++1000(55)	++++2000(111)	mg/dl(mmol/L)

Рис. 2.1. Шкала оцінки результатів основних біохімічних показників сечі у системі DUS 10, використаній в дослідженні

2.4.3. Забір та дослідження органів тварин. Після завершення дослідження, тварин виводили з експерименту шляхом внутрішньом'язової ін'єкції трибромостанолу [98] та наступної цервікальної дислокації [100–102]. Проводили розтин тварин, при цьому здійснювали мікрофотографування органів тварин, зокрема печінки, жовчного міхура та ін. Для мікрофотографування використовували камеру Nikon D7100 та макрооб'єктив MicroNikkor (Nikon, Японія).

В усіх тварин брали зразки лівої латеральної частини печінки, яку фіксували у 4%-му розчині параформальдегіду упродовж 6 год, потім розчин міняли і фіксували орган ще 24 год., після чого розчин міняли на 70%-ий розчин етанолу і проводили заключення органу в парафін, отримували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм, які депарафінізували і фарбували гематоксилін-еозином відповідно до загальноприйнятих методик [103].

Жовчні міхурі відділяли при основі, попередньо затиснувши протоки мікрозажимами, їх переносили в чашку Петрі та здійснювали

мікрофотографування, після чого розрізали скальпелем і здійснювали мікрофотографування жовчних каменів, якщо такі були, отриману рідку частину збирали і осаджували центрифугуванням для отримання жовчних міхурів. Тканинну оболонку жовчних міхурів фіксували як описано вище.

2.4.4. Виготовлення гістологічних препаратів. Тканини фіксували у 10%-му розчині формаліну протягом 24 год, промивали у проточній воді та зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (від 70 до 96 %), ущільнювали у парафіні, заливали у блоки та виготовляли зрізи, які фарбували гематоксиліном та еозином для загальноморфологічних досліджень.

Депарафінізацію препаратів проводили, по чергово занурюючи препарати у розчини: толуолу 1 (10 хв), толуолу 2 (10 хв), толуолу 3 (10 хв), спирту етилового 96%-го (10 хв), спирту етилового 70%-го (10 хв), воду (10 хв). Після цього препарати інкубували із біотинільованими лектинами: на зріз наносили 200 мкл розчину Рінгера, додавали 1 мкл відповідного біотинільованого лектину та інкубували 1 год при +37°C. Препарати промивали 1 раз та наносили на зріз 200 мкл розчину Рінгера, додавали 0,5 мкл авідин-HRP та інкубували 30 хв при +37°C. Промивали 1 раз розчином Рінгера. Додавали по 1 мл субстрату (розчиняли у 10 мл дистильованої води 0,01 г ДАБ, додавали 50 мкл 10%-го NiCl_2 та 60 мкл 3%-го перекису водню) та інкубували 5 – 15 хв. Промивали розчином Рінгера. Висушували препарати. Виготовляли постійні препарати, використовуючи канадський бальзам.

2.4.5. Гістологічний аналіз та фарбування гематоксилін-еозином. Отримані препарати зразків печінки мікрофотографували за допомогою мікроскопу Delta Optical, використовуючи об'єктиви 10x NA 0.4 та 40x NA0.75 та камери E3 Sony IMX185 (Rising Tech, Гонк-Конг) з використанням стандартизованих параметрів збільшення та освітлення. Отримані зображення обробляли в програмі ImageJ, де визначались контури окремих гепатоцитів та вимірювалась площа окремих клітин. Для кожного препарату проводили зйомку та

аналіз принаймні трьох полів зору, для кожного з яких вимірювали мінімум 100 клітин. Для гістологічної оцінки ушкодження печінки використовували критерії описані в [104].

2.4.6. Гістологічний аналіз вмісту колагену. Після депарафінізації зразків та інших процедур, як це описано у розділі 2.4.4, здійснювали зафарбовування пікриновою кислотою – тіазиновим червоним по Домагку [105]:

- а) зафарбовування ядер залізним гематоксиліном Вейгерта, 2 хв;
- б) ретельна промивка в проточній воді, 10 хв;
- в) зафарбовування в пікриновій кислоті – тіазиновим червоним, 3 – 5 хв;
- г) ополіскування в дистильованій воді;
- д) дві порції 96%-го спирту; абсолютний спирт; ксилол; бальзам.

Результат: ядра темнокоричневі, сполучна тканина яскравочервона, м'язова тканина жовта.

Приготування розчину: до 100 см³ насиченого водного розчину пікринової кислоти додають 7,5 см³ 1%-го водного розчину тіазинового червоного.

Для збереження і прозорості препаратів важливо, щоб лишня пікринова кислота була добре відмита 96%-им спиртом. Цей метод можна поєднувати з ядерним зафарбовуванням хромовогогалуновим карміном.

2.4.7. Імуногістохімічний аналіз. Фарбування матеріалу, отриманого шляхом нанесення холестеринових каменів на скельце, та наступного промивання ацетоном (що призводило до розчинення каменів та фіксації зразків), здійснювали за допомогою пропідій йодиду (виявлення ДНК) та антитіл до нейтрофільної еластази, як описано в [5].

Для дослідження флуоресценції використовували мікроскоп Olympus BX51(Carl Zeiss, Німеччина), обладнаний системою фазового контрасту. У роботі використовували пропідій йодид (довжина хвилі збудження 536 нм, емісії 617 нм). Для виявлення антитіл до нейтрофільної еластази використовували другі антитіла, мічені барвником Cy5.5, який виявляли за інфрачервоною емісією (при збудженні

650 нм та емісії 680 – 750 нм). Для обробки зображень використовували програмний комплекс Olympus Cell.

2.4.8. Мікроскопія та мікрофотографування. Для дослідження флуоресценції використовували мікроскоп Carl Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, Німеччина), обладнаний системою диференційного інтерференційного контрасту. У роботі використовували пропідій йодид (довжина хвилі збудження 536 нм, емісії 617 нм) для виявлення некротичних та пізньоапоптичних клітин за проникністю плазматичної мембрани. Для виявлення гліканів поверхні плазматичної мембрани, клітини поміщали у розчин Рінгера, що містив лектини, мічені FITC, у кінцевій концентрації 2,5 мкг/мл, та спостерігали зелену флуоресценцію (довжина хвилі збудження FITC – 494 нм, емісії 518 нм). Для виявлення ядер клітин використовували DAPI (довжина хвилі збудження 358 нм, емісії 461 нм), робоча концентрація 1 мкг/мл. Флуоресценцію фіксували за допомогою камери Carl Zeiss AxioCam MRm.

Для здійснення конфокальної мікроскопії використовували мікроскоп Carl Zeiss LSM 780, оснащений лазерами з довжинами хвиль 405, 458, 488, 514 та 633 нм.

Для здійснення автоматизованої флуоресцентної мікроскопії високої роздільної здатності використовували автоматизований мікроскопічний комплекс Keyence BZ-X800.

Для мікрофотографування жовчних міхурів використовували камеру Nikon D7100 та макрооб'єктив MicroNikkor (Nikon, Японія). Жовчний міхур відділяли при основі, попередньо затиснувши протоки мікрозатискачами, їх переносили в чашку Петрі та здійснювали мікрофотографування, після чого розрізали скальпелем і здійснювали мікрофотографування жовчних каменів, вміст фіксували метанолом для наступного дослідження флуоресцентною мікроскопією.

Для дискримінації нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів в парафінових зрізах нами запропонований наступний метод селективного фарбування еозинофільних гранулоцитів. Після депарафінізації зразки тканин

фарбували аніліновим синім, 0,001 %-им розчином протягом 60 с. Клітинну ДНК забарвлювали розчином 0,1 мкг/мл пропідію йодиду (PI) або розчином 0,1 мкг/мл DAPI (4',6-діамідіно-2-феніліндол, Sigma, Мюнхен, Німеччина) або розчином Sytox Green (готовий розчин, надається виробником, ThermoFisher Scientific, Німеччина). Препарати вкривали середовищем проти вигорання флуоресцентних міток і в такий спосіб ми змогли добитися відтворюваності сигналу при зберіганні зразків до 3 тижнів при 4°C у захищеному від світла середовищі.

2.4.9. Проточна цитометрія. Здійснювали відповідно до протоколу [106]. Суспензію клітин (1 – 2 млн. клітин/мл) промивали холодним забуферним фізіологічним розчином (ЗФР), а потім ресуспендували в 1 мл холодного розчину Рінгера. До клітинної суспензії додавали флуоресцентні мітки для виявлення життєздатності клітин (AnV-FITC, AnV-eGFP, NPL-FITC) до кінцевої концентрації 1 мкг/мл, а також пропідій йодид (PI), 1 мкг/мл, для дискримінації некротичних клітин. Альтернативно додавали антитіла для імунофенотипування (усі зразки виробництва BioLegend), використовуючи рекомендовані виробником титри антитіл. Зразки інкубували на холоді протягом 15 хв. Зразки аналізували на проточних цитофлуориметрах Coulter EPICS XL-MCL та Coulter DxFLEx (Beckman Coulter, Бельгія), визначали флуоресценцію відповідних міток на каналах FL1-FL5 а також визначали пряме (FSC) та бічне (SSC) світлорозсіяння популяції клітин відповідно до загальноприйнятих підходів [107]. Аналіз даних проводили у програмному забезпеченні CytExpert 3.0 та Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, Бельгія).

2.4.10. Визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG та асоційованих імунних комплексів. Аналіз здійснювали відповідно до раніше запатентованої [108] та валідованої методики [109, 110]. Для визначення вмісту імуноглобулінів IgG загальних та асоційованих імунних комплексів IgG-IgM у сироватці, у 96-лунковий імунологічний планшет (Nunc, Maxisorp) вносили по 50 мкл F(ab')₂ фрагментів антитіл до імуноглобуліну IgG (H+L) людини із концентрацією 2 мкг/мл у 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері, pH 9,6,

антитіла в активуючому буфері сорбувались на поверхні імунологічного планшету. Планшети інкубували 12 год при 4°C. Відмивали три рази забуференим фізіологічним розчином з 0,1 % детергенту Tween20 (ЗФР-Т). Вільні сайти зв'язування блокували 4%-им бичачим сироватковим альбуміном у ЗФР-Т по 100 мкл/лунку протягом 2 год при 37°C. Відмивали три рази ЗФР-Т та додавали розчин сироватки (1:1 000) в цьому ж буфері, або серійні розведення сироваток для визначення титру інкубації. Інкубували 1 год при кімнатній температурі. Промивали тричі ЗФР-Т. Для виявлення рівня IgG, який використовували для нормалізації сигналу, додавали антитіла (1:15 000) проти IgG миші, кон'юговані із пероксидазою. Для виявлення циркулюючих імунних комплексів додавали антитіла (1:5 000) проти імуноглобулінів IgM, кон'юговані із пероксидазою (таким чином з планшетом зв'язувались імунні комплекси, розпізнані анти-IgG антитілами, а самі комплекси оцінювали за кількістю анти-IgM мішеней зв'язування). Інкубували 1 год при кімнатній температурі, промивали тричі ЗФР-Т та вносили по 50 мкл хромогенної речовини тетраметилбензидину, яка окиснювалась пероксидазою до забарвленого продукту, інкубували у темноті впродовж 10 – 15 хв до появи кольору (порівнювали із стандартом) після чого додаванням 50 мкл 10%-ої сульфатної кислоти зупиняли дію ензиму та вимірювали поглинання світла при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000.

2.4.11. Лектин-імуоферментний аналіз для визначення глікозилювання імуноглобулінів. Аналіз здійснювали відповідно до запатентованого методу [108]. Для цього у 96-лунковий імунологічний планшет (Nunc, Maxisorp) вносили по 50 мкл F(ab')₂ фрагментів антитіл до імуноглобуліну IgG (H+L) людини із концентрацією 2 мкг/мл в 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері, рН 9,6, антитіла в активуючому буфері сорбувались на поверхні імунологічного планшету. Планшети інкубували протягом ночі при 4°C. Відмивали три рази ЗФР-Т, який додатково містив 1 mM CaCl₂, MgCl₂ (ЗФР-Т-Ca) (дані іони необхідні для зв'язування лектинами їх мішеней). Вільні сайти зв'язування блокували 3%-им

деглікозильованим желатином у ЗФР-Т-Са протягом 2 год при 37°C. Промивали тричі ЗФР-Т-Са та вносили розчин сироватки (1:2 000) в ЗФР-Т-Са. Інкубували 1 год при 37°C. Відмивали три рази ЗФР-Т-Са та додавали біотинільовані лектини LCA (*Lens culinaris agglutinin*) або AAL (*aleuria aurantia lectin*) у концентрації 50 нг/мл. Інкубували 1 год при 37°C. Тричі промивали ЗФР-Т-Са, вносили розчин стрептавідин-пероксидази (1:10 000) та інкубували 1 год при 37°C. Тричі промивали ЗФР-Т-Са та додавали по 50 мкл хромогенної речовини тетраметилбензидину, яка окиснювалась пероксидазою до забарвленого продукту, інкубували у темноті впродовж 10–15 хв до появи кольору (порівнювали із стандартом) після чого додаванням 50 мкл 10%-ої сульфатної кислоти зупиняли дію ензиму та вимірювали поглинання світла при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000.

2.4.12. Визначення вмісту специфічних імуноглобулінів IgG у зразках сироваток. Методика наводиться на прикладі визначення антитіл до овальбуміну.

Для визначення вмісту у сироватці імуноглобулінів IgG проти овальбуміну, використаного для імунізації, у 96-лунковий імунологічний планшет (Nunc, Maxisorp) вносили по 50 мкл овальбуміну яйця курей (Sigma, Німеччина) 2 мкг/мл у 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері, рН 9,6. Антиген в активуючому буфері сорбувався на поверхні імунологічного планшету. Планшети інкубували 12 год при 4°C. Відмивали три рази ЗФР-Т. Вільні сайти зв'язування блокували 4% -им бичачим сироватковим альбуміном у ЗФР-Т по 100 мкл/лунку протягом 2 год при 37°C. Відмивали три рази ЗФР-Т та додавали розчин сироватки (1:1 000) в цьому ж буфері, або серійні розведення сироваток для визначення титру інкубації. Інкубували 1 год при кімнатній температурі. Промивали ЗФР-Т та додавали антитіла (1:15 000) проти IgG миші, кон'юговані із пероксидазою. Інкубували 1 год при кімнатній температурі, промивали ЗФР-Т та вносили по 50 мкл хромогенної речовини тетраметилбензидину, яка окиснювалась пероксидазою до забарвленого продукту, інкубували у темноті впродовж 10–15 хв до появи кольору (порівнювали із стандартом) після чого додаванням 50 мкл 10%-ої сульфатної

кислоти зупиняли дію ензиму та вимірювали поглинання світла при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000.

2.4.13. Визначення індексу фіброзу у тварин методом ІФА. За основу тесту, ми взяли принцип тесту Siemens ELF™ [111, 112], який визначає наступні специфічні маркери ушкодження тканин печінки, притаманні фіброзним перетворенням: гіалуронову кислоту (ГК), аміно-кінцевий пептид проколагену III (PІІІNP) та тканинний інгібітор металопротеїназ-1 (TIMP-1). Для визначення PІІІNP було використано антитіла компанії Abcam Recombinant Anti-Pro-Collagen III alpha 1 antibody [EPR24257-57] (ab278080), для визначення TIMP-1 використано антитіла Abcam Anti-TIMP1 antibody [EPR16616] (ab179580). Для ГК нами не виявлено комерційно доступних антитіл відповідної видової специфічності, тому нами було створено необхідні антитіла. Для цього колекцію зразків ГК різних молекулярних мас (Lymphar Biotech Co) було кон'юговано з нанoad'ювантами, як описано [59], здійснено імунізацію кролів, виділено сироватку та очищено антитіла використовуючи осадження сульфатом амонію, афінну хроматографію на протеїн-G-сефарозі (SigmaAldrich, США) та очистку на афінній колонці із метилцелюлози з кон'югованою гіалуроновою кислотою (НВК «Лектинотест», Україна), перевірено їх афінність. Імуноферментний аналіз здійснювали як описано раніше [53, 113].

2.4.14. Виділення гранулоцитів із периферичної крові. 20 мл периферичної крові людини розводили 10 мл 1x ЗФР, рН 7,4 із 10 Од/мл гепарину. Отриману суміш нашаровували на 15 мл градієнту фіколу Lymphoflot і осаджували протягом 20 хв при 2 000 об/хв. Після такого фракціонування відбирали піпеткою кільце, що містило лімфоцити і моноцити (між плазмою і фіколом) у 50 мл пробірку Falcon, а тонкий шар гранулоцитів над осадом еритроцитів (разом із частиною еритроцитів) переносили в іншу пробірку. Суспензію гранулоцитів із еритроцитами обробляли 36 мл холодної стерильної дейонізованої води, акуратно перемішуючи протягом 20 с, після чого додавали 4 мл 10x ЗФР і центрифугували

при 1 800 об/хв протягом 5 хв. Процедуру повторювали до зникнення червоного осаду еритроцитів. Частину гранулоцитів залишали на 24 год в RPMI-1640 при +37°C та 5 % CO₂ для індукції апоптозу шляхом зістарення. У процесі виконання роботи використовували клітини лінії Jurkat (лінія лейкозних Т-лімфоцитів людини), HeLa (рак шийки матки людини), гранулоцити, виділені із периферичної крові людини, Сасо-2/ТС7 (рак товстої кишки). Клітини лінії Jurkat та HeLa культивували у середовищі RPMI («Sigma-Aldrich», США) у присутності декомплементованої сироватки крові великої рогатої худоби і 50 мкг/мл гентаміцину.

2.4.15. Визначення еластази нейтрофілів у сироватці крові. Визначення нейтрофільної еластази в сироватках крові здійснювали відповідно до [114] із зразків замороженої сироватки, інкубуючи її із флуорогенним субстратом еластази N-метоксицукциніл-Ala-Ala-Pro-Val-7-амідо-4-метилкумарином (MeOSUc-AAPV-AMC) (Santa Cruz Biotechnology) у чорних 96-лункових мікроплашках (ThermoFischer Scientific), як описано [115]. Для калібровки використовувалась людська еластаза (Sigma), аналіз здійснювався на приладі Perkin Elmer HTS7000 BioAssay Reader.

2.4.16. Аналіз НПП за екстерналізацією ДНК. Гранулоцити людини виділяли із гепаринізованої венозної крові нормальних здорових донорів центрифугуванням градієнта густини гранулом Lymphoflot (Bio-Rad, Hercules, Каліфорнія, США). Шар, багатий гранулоцитами на верхівці еритроцитів, був узятий та підданий гіпотонічному лізису RBC. Ізольовані гранулоцити регулярно перевіряли на життєздатність [116] і поміщали в 96-лункові культуральні планшети по 5×10^6 клітин на мілілітр із зазначеними індукторами утворення НПП у присутності флуоресцентного барвника нуклеїнової кислоти SYTOX Green (Life Technologies, Waltham, MA, США). Оскільки гранулоцити непроникні для барвника, тому метод виявляв лише позаклітинну ДНК; необроблені нейтрофіли слугували фоном, оскільки після виділення вони були схильні до спонтанного

утворення НПП [117], РМА, форбол-12-міристан-13-ацетат використовували як сильний індуктор (позитивний контроль). Флуоресценцію вимірювали в кінетиці протягом 4 год, використовуючи зчитувач BioAssay HTS7000 (Perkin Elmer), збудження 480/15 нм, випромінювання 535/20 нм.

2.4.17. Мічення наночастинок та відстеження їх розподілу *in vivo*. Мічення нанодіамантів ближнім інфрачервоним флуоресцентним барвником CF790 (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, штат Міссурі, США) проводили відповідно до рекомендацій виробника. Для цього CF790 розводили в диметилсульфоксиді до кінцевої концентрації 10 мМ. 30 мкл цього розчину змішували з 5 мг НЧ (2,5 мг/мл, попередньо розчиненими в 0,1 М бікарбонатному буфері, рН 8,3). Реакційний розчин інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Для зупинки реакції додавали 50 мкл 1 М лізину.

1 мг мічених НЧ вводили внутрішньочеревно швейцарським голим мишам (здійснювалось в CNRS, м. Лілль, відповідно до протоколів затверджених в установі). Відстеження *in vivo* з міченими НЧ проводили за допомогою системи Bruker In-Vivo Xtreme (Bruker, Массачусетс, США), оснащений 16 МП CCD детектором, ксеноновим флуоресцентним освітлювачем потужністю 400 Вт (збудження 760 нм, емісія 830 нм) та інтегрованим модулем нагріву, та за допомогою системи LiCor Perl Trilogy (LiCOR, США). Дані були проаналізовані високоефективним програмним забезпеченням Bruker Molecular Imaging (MI) та LiCor Studio. Фотографії представляють дзеркальні зображення мишей. Тварин під час процедури візуалізації анестезували сумішшю ізофлуран-кисень. Зображення (час експозиції) тривав 40 секунд.

2.4.18. Статистичний аналіз. Статистичний аналіз даних проводили з використанням програмного забезпечення Prism7 (GraphPad) та Excel (Microsoft, США). Для оцінки відмінності досліджуваних масивів даних використовували наступні критерії: для параметричних даних – t-критерій Ст'юдента (парний та непарний), для непараметричних даних використовували U-критерій Манна-Уїтні

для оцінки зв'язку між двома популяціями (тварини у досліджуваних популяціях, де $n < 30$). Для кожного із параметрів визначали рівень достовірності, використовували наступні градації рівнів достовірності: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$. Дані вважали достовірними, якщо $p < 0,05$. Для отриманих даних визначали середні значення та стандартну похибку середнього ($M \pm m$), які вказані на рисунках і в таблицях, якщо не зазначено інше.

При аналізі площі гістологічних препаратів визначали середнє значення площі для усього масиву клітин у кожному полі зору, це значення і використовували для подальшого аналізу. Досліди із визначення титру антитіл проводили у трьох паралелях у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината стовпчиків на діаграмах відповідає середньому значенню M , розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з декількох однотипних експериментів. Середню похибку m отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки σ . При локалізації флуоресцентних сигналів за допомогою програмного забезпечення ImageJ (НИН, США) використовували критерій χ^2 Пірсона. Набір і макетування тексту проводили за допомогою програми Microsoft Word. Статистичну обробку отриманих даних проводили в програмі Microcal Origin 7 (Microcal, США).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В даному розділі описано вплив ендогенних НЧ на прикладі кристалів холестерину та моноурату натрію на утворення НПП в гепатобіліарній системі, зокрема жовчому міхурі та печінці, здійснено пошук шляхів запобігання гіперактивації нейтрофілів з метою ушкодження даних тканин (розділ 3.1) та здійснено пошук безпечних екзогенних НЧ, здатних селективно індукувати утворення НПП в ділянках їх введення в організм та забезпечувати посилення імунної реакції до антигенів, діючи як ад'юванти (розділ 3.2).

3.1. Ендогенні наночастинки в гепатобіліарній системі та їх роль в активації нейтрофільних гранулоцитів та індукції запальної реакції

У цьому підрозділі описано фізіологічні зміни тварин за станів, асоційованих із утворенням НПП та визначено роль НПП у розвитку системного запального процесу. Ми визначали динаміку ушкодження тканин печінки та фізіологічних змін, досліджували можливі причини, задіяні у розвитку стеатогепатиту у лабораторних мишей лінії C57BL6/N та здійснювали пошук шляхів їх усунення, впливаючи на НПП.

Для цього нами була розроблена тваринна модель НАЖХП та стеатогепатиту, що базувалась на проведенні гістологічного аналізу тканин печінки у лабораторних мишей лінії C57BL6/N, а також дослідженні зміни маси тіла, біохімічних показників, визначення маркерів хронічного системного субгострого запалення та маркерів ушкодження тканин печінки в крові.

Огляд новітніх літературних даних показує, що утворення НПП є важливим компонентом у фізіології печінки та шлунково-кишкового тракту [118], а також при патології печінки [119]. Згідно з інформацією ВООЗ у високорозвинених країнах у кожної четвертої людини є ознаки НАЖХП як результату надмірного вживання шкідливої їжі. НАЖХП, що в кінцевому підсумку призводить до НАСГ, є важким станом, що вражає 25 та 5 % населення, відповідно. Згідно із даними спеціального

випуску журналу Nature Medicine, присвяченому патології печінки [69], на сьогодні немає єдиної ідеальної тваринної моделі з НАЖХП, яку можна використати для дослідження перебігу цього захворювання та пошуку методів лікування.

Саме тому актуальним завданням є модифікація та вдосконалення вже існуючих моделей. На даний час єдиною доступною тваринною моделлю НАЖХП є високоліпідна високохолестеринова дієта мишей та щурів, проте вона вимагає 12 – 24 тижні для прояву фенотипу в мишей лінії Balb/c, C57Bl6/J та щурів лінії Wistar [120]. Зважаючи на тривалість життя гризунів, дана модель є не практичною для ефективного дослідження патології. Припускаючи роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку патології гепатобіліарної системи, зокрема утворенні жовчних каменів [11], та знаючи про важливий вплив окисних систем в утворенні НПП на першому етапі нами було запропоновано використовувати тваринну лінію із зміненим окисативним статусом для ефективного відтворення НАСГ в мишей.

Останні літературні дані вказують на безпосередню участь фруктози в індукції НАЖХП [78], а оскільки до індукторів запалення в печінці належить жовч, яка спричиняє загибель гепатоцитів [75], ми припустили зв'язок ВФД та ВЛВХД із запальними процесами в шлунково-кишковому тракті внаслідок утворення НПП.

Для перевірки цієї гіпотези ми використали запропоновану нами модель НАСГ у лабораторних мишей, яких утримували на високофруктозній та високохолестериновій дієтах.

3.1.1. Тваринні моделі для дослідження НАЖХП. Є дві основні причини широкого розповсюдження патології НАЖХП, пов'язані з діагностикою хвороби, а саме:

1. відсутність надійних (специфічних та чутливих) маркерів захворювання, які можна було б виявляти в крові шляхом простих скринінгових процедур;
2. відсутність тваринних моделей, в яких можна було б відтворити захворювання з метою тестування потенційних лікарських препаратів.

Оскільки НАЖХП включає багато систем і органів, як описано вище, її неможливо відтворити в культурі клітин чи сфероїдних культуральних системах,

або виділених з організму і вирощених в лабораторних умовах первинних клітинах людини.

В низці робіт зроблено огляд останніх новітніх досягнень в галузі моделей дослідження печінки [121–125]. Проте у спецвипуску журналу Nature (грудень 2017), присвяченому дослідженню НАЖХП, вказано, що все ж єдиною правильною моделлю можна вважати модель ВЛВХД у мишей [69].

Звісно ж, при дослідженні патології травної системи у гризунів слід пам'ятати про різницю у фізіології мишей і людини. У гризунів основним кормом є злаки і тому вони рідко коли стикаються з високим вмістом ліпідів у їжі. Також є певні інші біохімічні відмінності.

Зважаючи на опубліковані дані щодо перспективності мишачої моделі [69], ми вирішили відтворити її на мишах лінії C57BL6/N. Дана лінія (паспорт лінії <https://www.jax.org/strain/005304>), відділилась від материнської лінії C57BL6 понад 50 років тому, хоч це виявили відносно недавно, у 2013 році [126]. Дана лінія зберегла функціональну копію гену Nnt (Nicotinamide nucleotide transhydrogenase, нікотин нуклеотид трансгідрогенази), який кодує інтегральний білок, розміщений у внутрішній мембрані мітохондрій, що відповідає за підвищене співвідношення мітохондріального НАДФН/НАДФ⁺ (NADPH/NADP⁺) [126] зі значним впливом на імунну систему тварини, зокрема активність нейтрофільних гранулоцитів. Таким чином лінія C57BL6/N володіє «здоровою» спадковістю (а також високою агресивністю, низькою кількістю потомків та іншою поведінкою, притаманною диким тваринам). Дана лінія не є широко використовуваною серед дослідників, оскільки на ній неможливо відтворити багато модельних лабораторних захворювань, які, проте, легко виникають в лінії, що втратила даний ген – C57BL6/J. У такий спосіб лінія C57BL6/N була майже повністю витіснена лінією C57BL6/J при проведенні лабораторних досліджень. Паспорт останньої знаходиться за адресою <https://www.jax.org/strain/000664>.

У Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького, де виконувалась робота, лінію мишей C57BL6/N успішно використовують для багатьох досліджень, пов'язаних із системними запальними

процесами та запальними станами, як зразок «здорового» контролю [127–129]. Контроль чистоти ліній здійснювався шляхом генотипування Медичним центром Університету Фрідріха Александра м. Ерланген-Нюрнберг (ФРН) відповідно до описаних методик [126].

Вважаючи, що дана лінія дозволить найкраще відтворити процеси, які відбуваються в організмі людини нами були проведені дослідження в рамках даної роботи, спрямовані на пошук тваринної моделі НАЖХП та НАСГ використовуючи кілька загальноприйнятих тваринних ліній та запропонову нами модель (рис. 3.1).

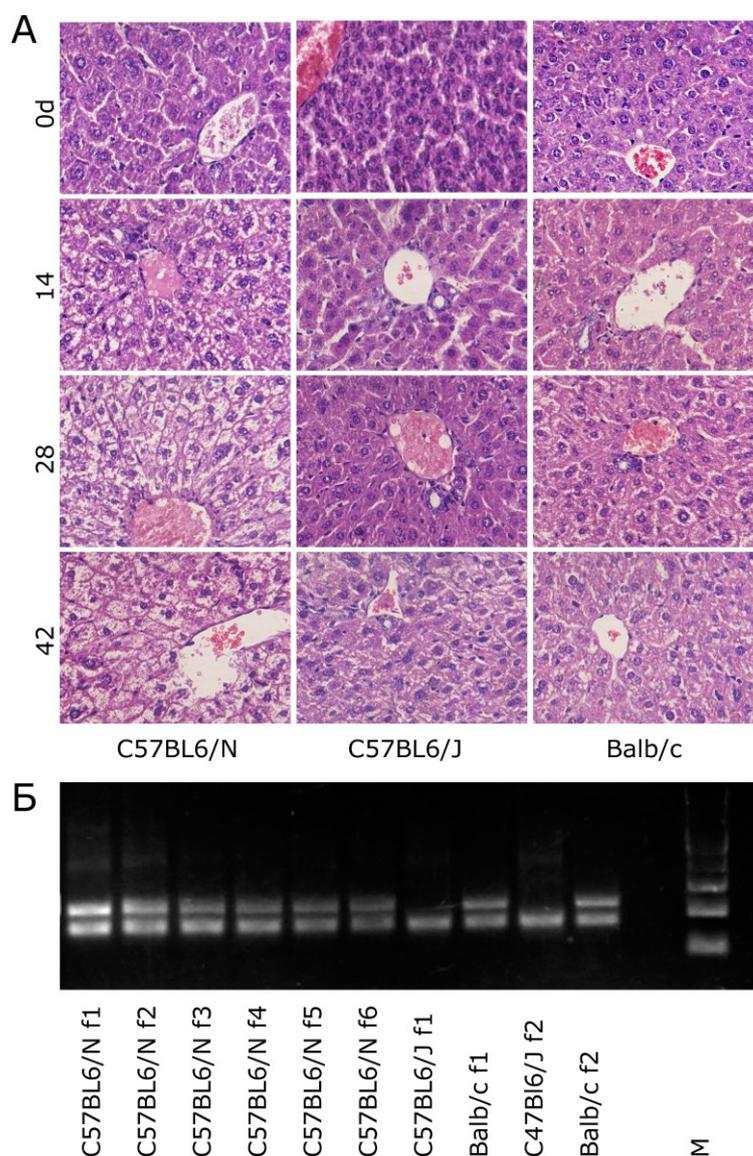


Рис. 3.1. А – морфологія тканин печінки лабораторних мишей різних ліній, що перебували на ВЛВХД протягом зазначеного ліворуч числа днів. Фарбування Н&Е, об’єктив 40x 0,95NA. Б – результати генотипування досліджуваних ліній тварин (різні сім’ї – f) на наявність гену Nnt

Як видно з наведених даних, втрата ядер в гепатоцитах, наявність ліпідних включень (білий колір) та руйнування структури жовчних проток (розташовані поблизу судин, вистелені кубічним епітелієм) спостерігалися в лінії C57BL6/N уже через 14 днів перебування на ВЛВХД, а у тварин лінії C57BL6/J (не експресують функціональну субодиницю Nnt) – на 42 день. У тварин лінії Balb/c зазначені патологічні зміни були менш виражені, незважаючи на експресії гену Nnt і виявлялися на 28 день експерименту.

3.1.2. Патофізіологічні зміни в організмі тварин за умов високоліпідної високохолестеринової дієти та високофруктозної дієти. На першому етапі роботи досліджували зміну маси тіла тварин за умов стандартного раціону, ВЛВХД та ВФД, поведінкові зміни тварин, визначали основні біохімічні показники сечі, досліджували патогістологічні зміни печінки та жовчних міхурів.

В експерименті використовували 3 групи тварин по 8 тварин в кожній, які перебували в умовах стандартного раціону, ВЛВХД та ВФД. Що кілька днів визначали масу тіла, також спостерігали за зміною поведінкових реакцій, які тричі упродовж експерименту зафільмовували в експериментальних умовах. Тривалість експерименту становила 4 тижні (28 днів). Схема експерименту представлена на рис. 3.2. По завершенню експерименту, у тварин здійснювали аналіз основних біохімічних показників сечі, тварин виводили з експерименту, здійснювали забір крові, тканин печінки та жовчних міхурів.

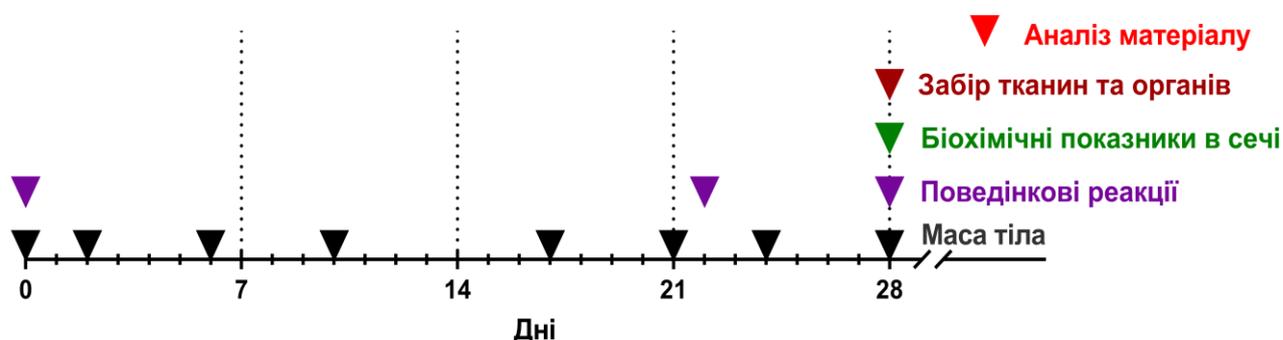


Рис. 3.2. Схема експерименту щодо визначення фізіологічних та патологічних змін у тварин за умов стандартного раціону, ВЛВХД та ВФД

Після переведення тварин на раціон експерименту, у перші дні ми спостерігали незначне зменшення маси тіла, що можна пояснити адаптаційними реакціями. Проте вже з 14 дня експерименту як ВЛВХД, так і ВФД спричиняли зростання маси тіла, яке було значно вищим, ніж у групі з стандартним раціоном (СР). Приріст маси тіла в межах 5 % у місяць є нормою для цієї вікової групи тварин і пов'язаний із природним ростом. Після розтину ми спостерігали ознаки відкладення вісцерального жиру у групах ВЛВХД та ВФД. Це й пояснює зростання маси тіла, що представлено на рис. 3.3.

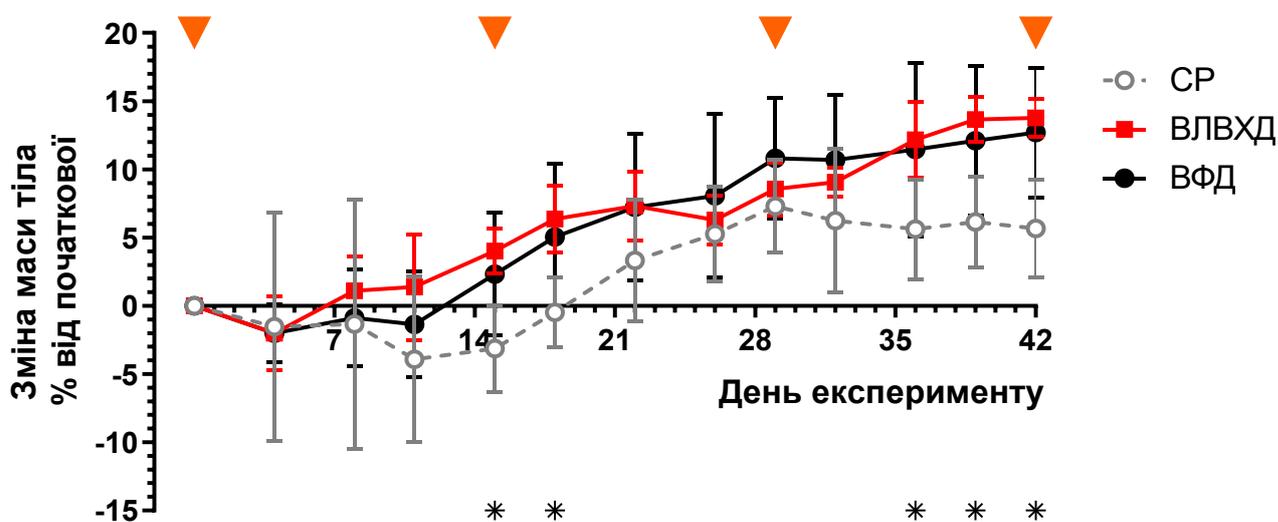


Рис. 3.3. Зміни маси тіла лабораторних мишей лінії C57BL6/N за умов стандартного раціону (СР), високофруктозної (ВФД) та високоліпідної високохолестеринової дієти (ВЛВХД). Наведені дані як $M \pm m$, у відсотках відносно початкової маси тварин (визначеної на 0 день). Трикутниками зазначено час забору зразків крові, в яких визначали активність еластази нейтрофілів. Зірочками позначено дні, коли значення ваги тварин на обох дієтах (ВЛВХД і ВФД) були достовірно відмінними від ваги тварин на стандартному раціоні

3.1.2.1. Зміни маси тіла тварин за умов ВЛВХД. Для оцінювання маси тіла проводили зважування тварин в середньому що три дні. Результати зміни маси тіла представлені на рис. 3.3. У групі із стандарним раціоном спостерігалось незначне зростання маси тіла, в середньому від 21,5 до 23,2 г, тобто збільшення становило 7 % від початкової маси тіла протягом 28 днів експерименту, що відповідає

нормальним значенням набору ваги підлітковими тваринами. Водночас, у групі ВЛВХД спостерігалось зростання маси тіла близько 25 %, із середнім значенням маси тіла близько 27,0 г у віці 12 тижнів, що є понаднормовими значеннями. Цікаво, що на початку експерименту, при зміні стандартного корму на високоліпідний, тварини відмовлялись від їжі і втрачали вагу. Це може бути спричинено як психологічною адаптацією до нового типу корму, так і опірністю організму високожировій їжі. Проте згодом після споживання високоліпідного корму у дослідній групі тварин спостерігався постійний посилений апетит. Дані зміни маси тіла між групами на стандартному раціоні та ВЛВХД статистично різнилися, починаючи з 6 дня експерименту ($p < 0.05$).

3.1.2.2. Поведінкові зміни тварин при ВЛВХД. Дослідження поведінкових реакцій показало істотні зміни у поведінці мишей. Слід відзначити, що миші лінії C57BL6/N є активними тваринами, вони не схильні до ожиріння, рухливі, агресивні, можуть атакувати дослідника. В приплоді дають до 5 – 6 мишенят, з яких частину можуть з'їсти, забезпечуючи виживання найсильніших особин. Вони є «одинаками», не схильні до утворення великих груп чи стад і потребують просторих кліток. Саме таку поведінку ми спостерігали в обох групах на початку експерименту. При поміщенні в прозорий контейнер тварини повністю займали усю доступну площу (розміщувались по кутах) і при цьому активно спостерігали за діями дослідника та оточенням (рис. 3.4, А). При постукуванні по контейнері вони високо підстрибували і намагались атакувати дослідника та/чи вистрибнути з контейнера (рис. 3.4, Б). Водночас уже після 20 днів ВЛВХД поведінка тварин значно змінювалась, спостерігалось зменшення рухливості та активності. Так, на 22 день експерименту тварини схильні згруповуватись у групи (рис. 3.4, В). Така соціалізація може бути наслідком відчуття у тварин нездатності захистити себе, тож групування допомагає уникнути потенційної небезпеки. Тепер постукування не викликало ні підстрибування, ні іншої помітної реакції. Така апатія до зовнішніх чинників спостерігалась і при помітному нахилі контейнера (рис. 3.4, Г).

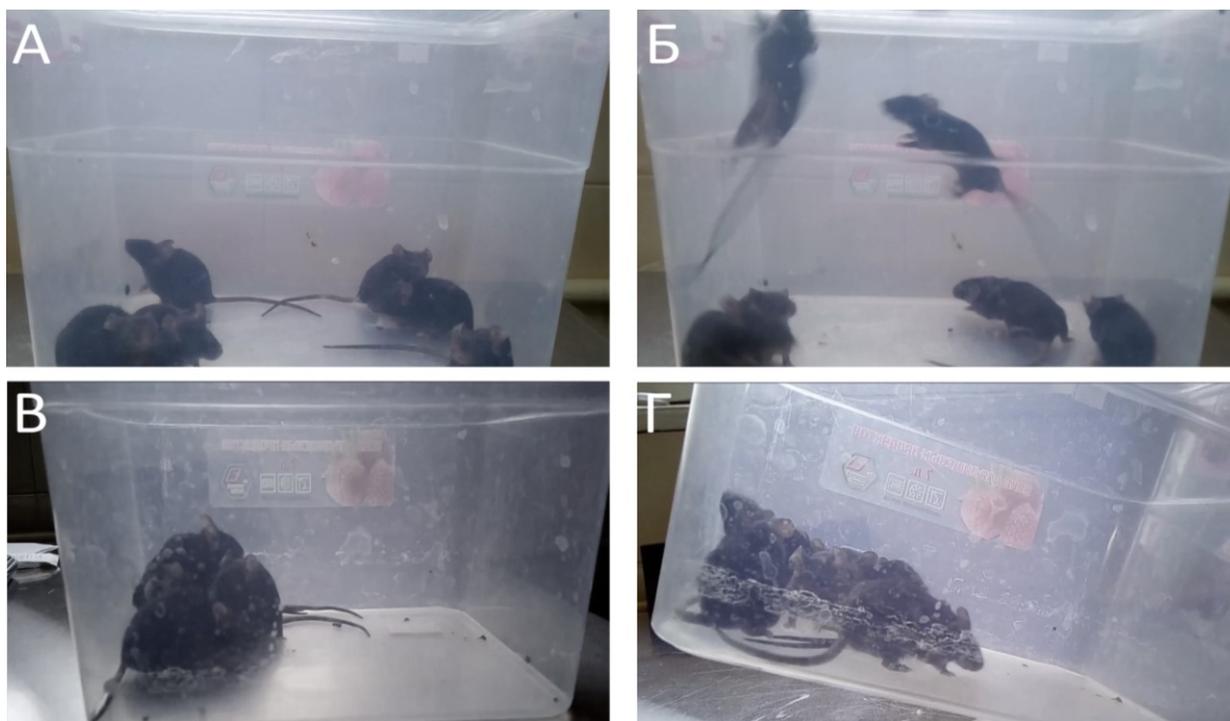


Рис. 3.4. Кадри з відео, що демонструють поведінку мишей на початку експерименту (А, Б) та на 22 день ВЛВХД (В, Г). А – тварини займають увесь простір контейнера, активно спостерігають за оточенням в оборонній позі, Б – при постукуванні по контейнеру активно підстрибують, атакуючи подразник, В – тварини згруповуються у тісні групи, є малорухливі та апатичні, Г – навіть при нахиланні контейнера тварини не виявляють помітної активності. Повна версія відео представлена у презентації даної роботи

3.1.2.3. Споживання їжі за умов ВЛВХД та ВФД. За умов ВЛВХД, коли ліпіди надходили в раціон з кормом, ми спостерігали зростання споживання корму, що містив ліпіди (при ВЛВХД), а також споживання рідини, що містила 10%-ий розчин фруктози (при ВФД). Останній процес був більше виражений, тож ми кількісно виміряли споживання рідини за умов ВФД, і, як бачимо з рис. 3.5, – вказані зміни були достовірно більшими ($p < 0.001$), ніж у тварин контрольної групи. Зауважимо, що зростання споживання як ліпідного корму, так і розчину фруктози у тварин ми спостерігали не одразу, а через певний час, зазвичай через 3 – 5 днів, які ми вважали періодом адаптації до нових умов харчування. Інколи тварини навіть зменшували споживання нетипового для них корму на 1 – 3 день, проте згодом його споживання значно зростало.

Водночас, нами не зафіксовано помітного зростання в сечі кетонів, крові, лейкоцитів, уробіліногену, білірубину. Також не виявлено різниці у показниках між групами за цими параметрами. Зазвичай рН було кислим в обох групах (6.0 – 6.5), а питома густина – високою (1,030), що, очевидно, обумовлено особливостями метаболізму досліджуваних тварин (рис. 3.7). Значення глюкози завжди були негативними.

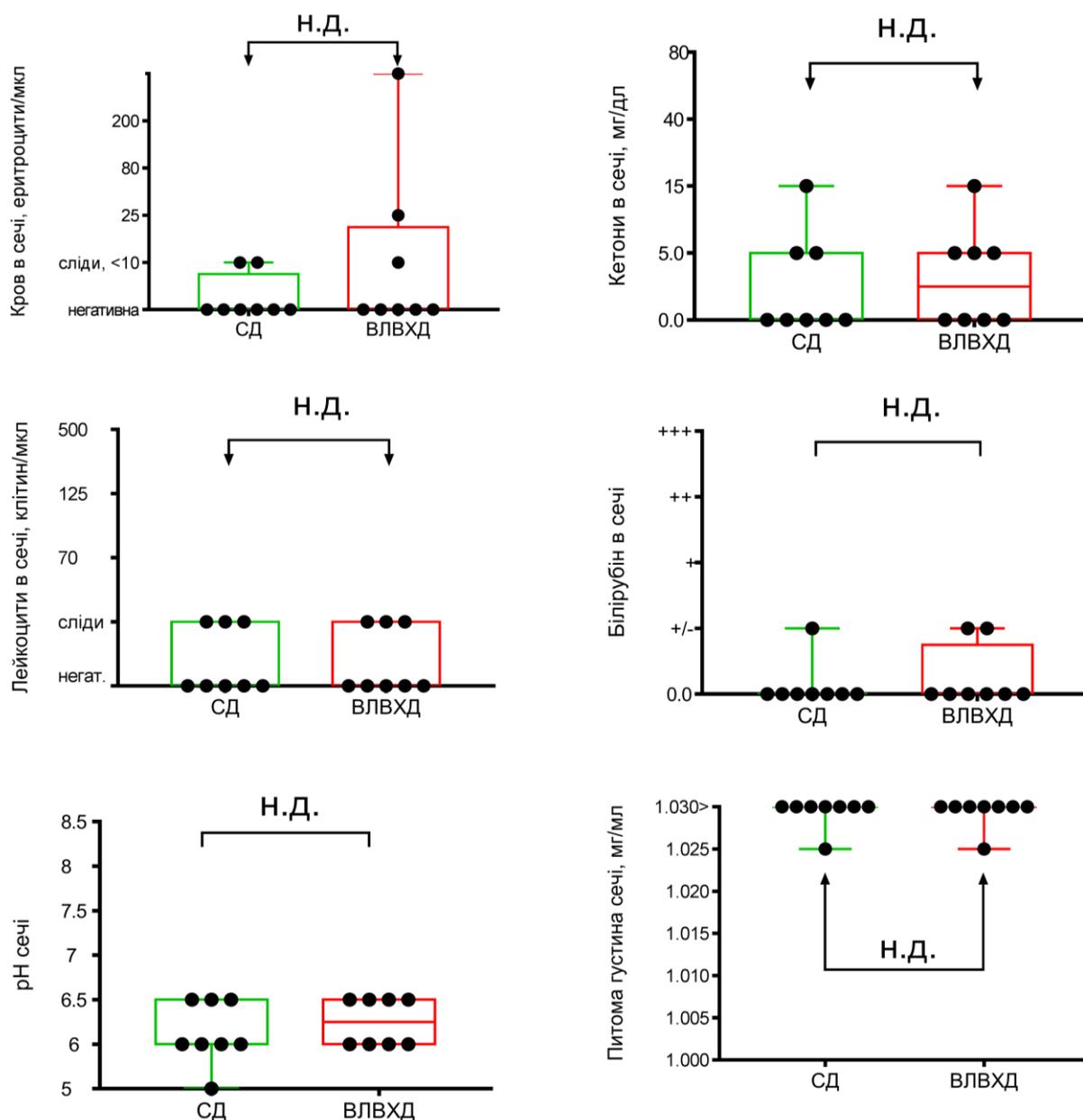


Рис. 3.7. Вміст крові, кетонів, лейкоцитів, білірубину у сечі, значення рН та питомої густини сечі у досліджуваних тварин, визначені напівкількісною експрес-системою DUS 10. Н.д. – недостовірно

3.1.3. Дослідження патологічних змін в печінці за ВЛВХД та ВФД.

Морфологічна оцінка органів травної системи, після виведення тварин з експерименту, показала видиму дисколорацію печінки та збільшення розмірів жовчного міхура у тварин, що перебували на ВЛВХД порівняно з СД. В окремому додатковому експерименті ми вивчили вплив ВЛВХД на органи травної системи упродовж довшого часу – 8 тижнів. В середньому лише 1/3 тварин доживала до 8 тижня на ВЛВХД, аутопсія виявляла майже повне знебарвлення тканин печінки. Такі морфологічні зміни із дисколорацією зазвичай відображають НАЖХП, НАСГ та цироз, відповідно [104]. Макрофотографії печінок та жовчних міхурів тварин на різний час експерименту, представлені на рис. 3.8, ілюструють типову картину змін. Макрофотографії тканини печінки, що перебували на СД, ВЛВХД та ВФД упродовж 6 тижнів представлено на рис. 3.9.



Рис. 3.8. Вплив стандартної дієти та ВЛВХД, упродовж 4 та 8 тижнів, на переродження печінки та наповнення її клітин жиром, а також на гіпертрофію жовчних міхурів

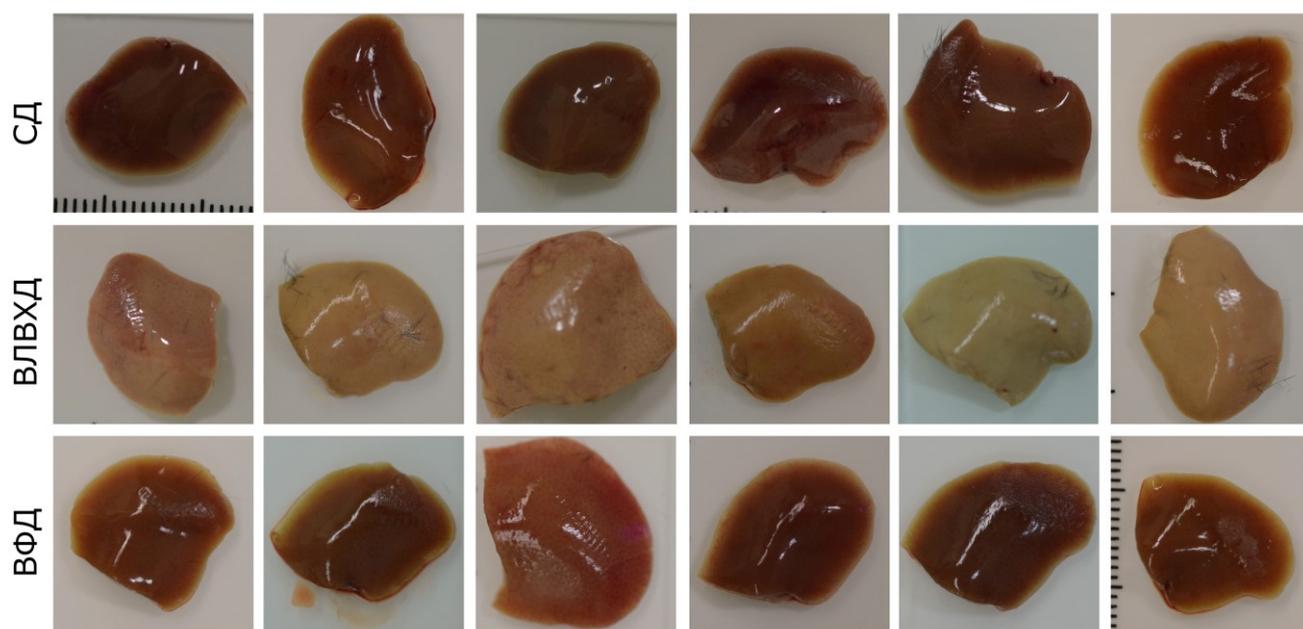


Рис. 3.9. Вплив стандартної дієти, ВЛВХД та ВФД упродовж 6 тижнів на тканини печінки та дисколорації внаслідок наповнення її клітин жиром

ВЛВХД спричиняла різку зміну кольору клітин печінки, водночас ВФД призводила до менше вираженої, проте добре помітної дисколорації тканин печінки.

Зважаючи на отримані нами дані, було проведено гістологічний аналіз зразків печінки. В усіх випадках здійснювали поперечний переріз лівої латеральної частки печінки (представленої на рис. 3.10), що дозволило легко порівняти патогістологічні зміни за умов дієти. Так, за СД спостерігали високу метаболічну активність клітин печінки, про що свідчили численні мітози та наявність двоядерних (тетраплоїдних) клітин; їх цитоплазма еозинофільна, позбавлена ліпідних включень, усі клітини містили добре видимі функціональні ядра. Епітелій жовчних проток добре збережений, містив чітко окреслені клітини. Васкуляризація печінки чітко виражена (рис. 3.10). Водночас при ВЛВХД на 28 день експерименту спостерігали видимий макростеатоз та мікростеатоз, при цьому в більшості гепатоцитів ядра були пікнотичними, що свідчить про запуск незворотніх процесів некрозу. Відповідно мітози чи двоядерні клітини були відсутніми. Цитоплазма гепатоцитів була заповнена ліпідними включеннями (не зафарбовані, при фарбуванні гематоксилін-еозином), а між клітинами спостерігались великі жирові

каплі (макростеатоз). Епітелій жовчних проток був подекуди зруйнованим (рис. 3.10).

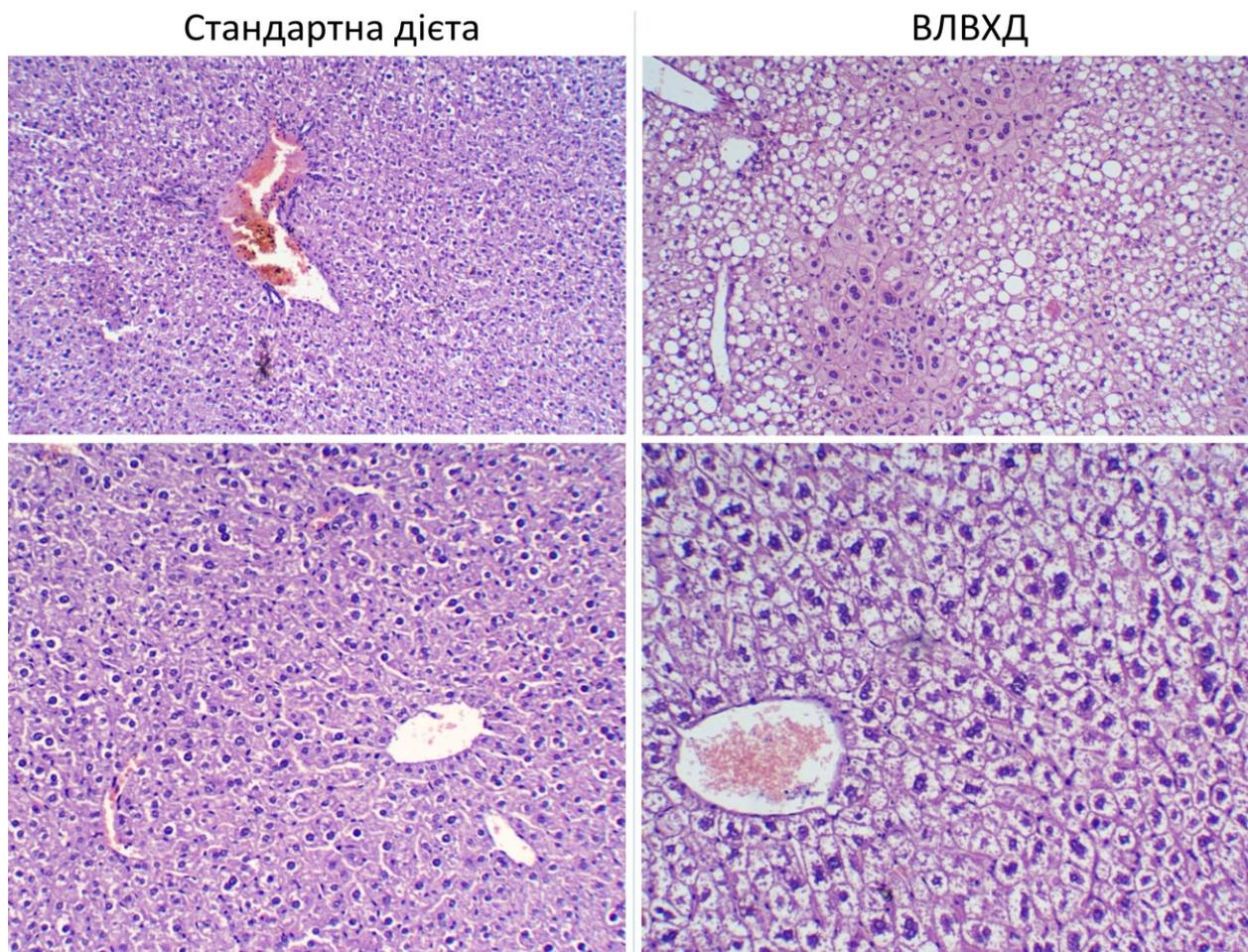


Рис. 3.10. Гістологічний аналіз препаратів печінки при стандартній та високоліпідній високохолестериновій дієті (ВЛВХД). Фарбування Н&Е, верхній ряд – об’єктив 10x 0,45NA, нижній ряд – об’єктив 40x 0,95NA.

Оскільки при ВЛВХД спостерігалась видима гіпертрофія гепатоцитів, для її кількісної оцінки було проведено оцінку ряду незалежних полів зору на цифрових мікрофотографіях, отриманих із різних ділянок препаратів печінки кожної із групи (по 2 препарати на тварину, 8 тварин у групі). За допомогою програмного забезпечення ImageJ оцінено площу гепатоцитів з метою кількісного аналізу (рис. 3.11).

Отримані дані свідчать про майже двократне зростання площі гепатоцитів на гістологічних зрізах, при цьому між СД та ВЛВХД спостерігалась достовірною різниця ($p < 0.0001$).

Гістологічний аналіз тканин печінки тварин після 6 тижнів перебування на ВЛВХД підтвердив морфологічні зміни притаманні НАСГ, зокрема зростання площі гепатоцитів за рахунок накопичення ліпідів, утворення пікнотичних ядер, зменшення кількості диплоїдних клітин, некроз гепатоцитів та накопичення позаклітинних ліпідів у вигляді ліпідних капель, лейкоцитарну інфільтрацію в ділянці печінкових триад (рис. 3.11).

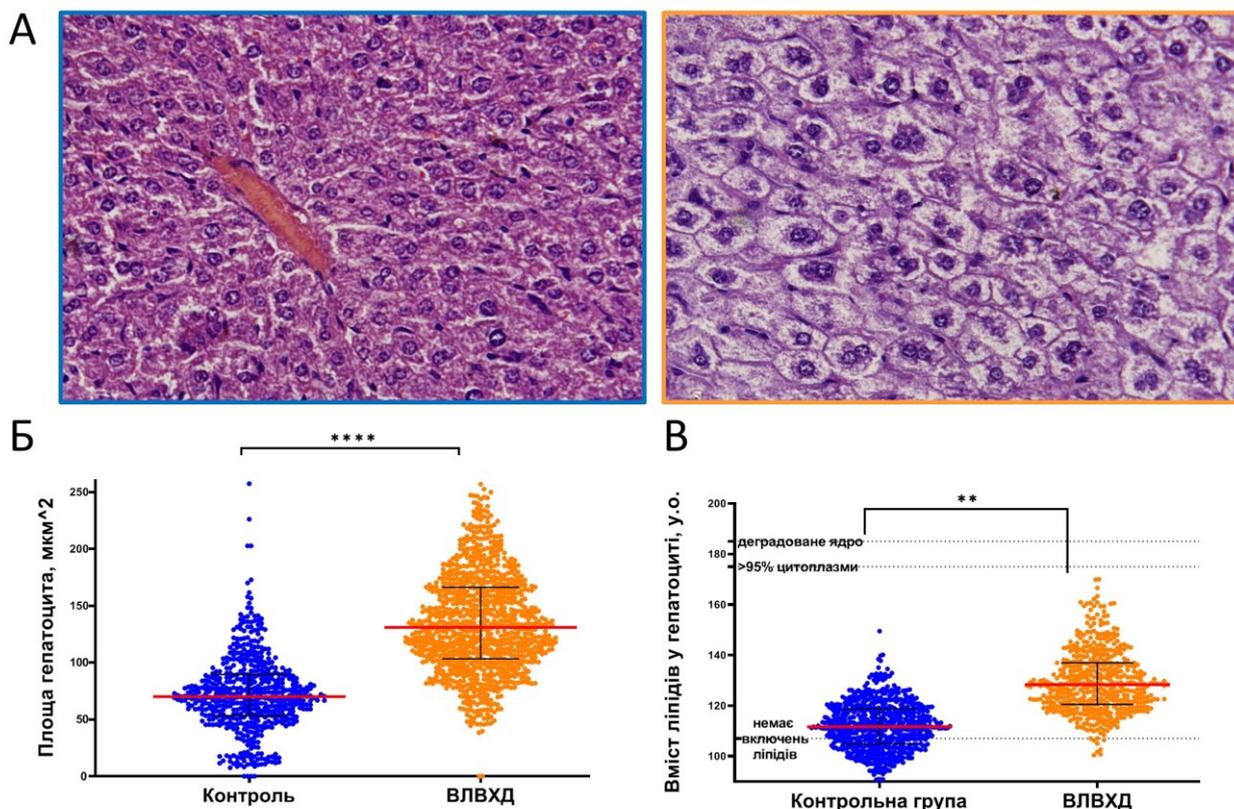


Рис. 3.11. Морфологічні зміни тканин печінки притаманні НАСГ, після 6 тижнів перебування лабораторних тварин на ВЛВХД. А – гістологічний аналіз тканин печінки, ліворуч – СД, праворуч – ВЛВХД, та морфометричний аналіз за показниками – Б – площа гепатоцитів, В – вміст ліпідів у гепатоцитах. Фарбування Н&Е, об'єктив 40x 0,95NA.

Аналогічні дані з менше вираженими ознаками НАСГ спостерігали в печінці тварин за умов перебування на ВФД. Гістологічний аналіз тканин печінки тварин після 6 тижнів перебування на ВФД підтвердив морфологічні зміни, притаманні НАСГ, зокрема зростання площі гепатоцитів за рахунок накопичення ліпідів,

утворення пікнотичних ядер, зменшення кількості диплоїдних клітин, некроз гепатоцитів та накопичення позаклітинних ліпідів у вигляді ліпідних капель (рис. 3.12).

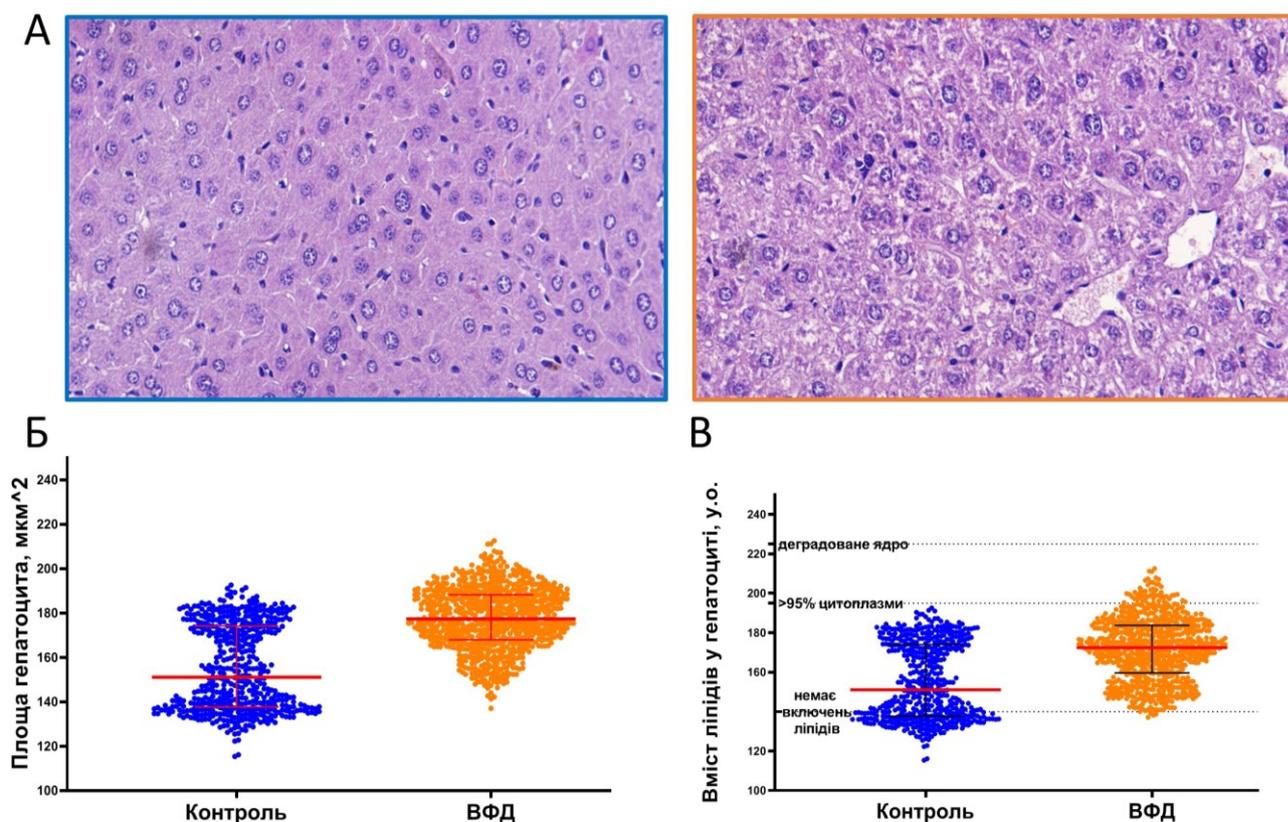


Рис. 3.12. Морфологічні зміни тканин печінки притаманні НАСГ після 6 тижнів перебування лабораторних тварин на ВФД. А – гістологічний аналіз тканин печінки, ліворуч – СД, праворуч – ВФД, та морфометричний аналіз за показниками – Б – площа гепатоцитів, В – вміст ліпідів у гепатоцитах. Фарбування Н&Е, об'єктив 40x 0,95NA.

Для більш повної оцінки ушкодження печінки, ми використали систему оцінки ушкодження печінки тварин, зокрема мишей, розроблену співробітниками Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, проф. Білим Р.О. та доц. Вовком В.І. [130], яка базується на відомих патологічних змінах печінки та гістологічних особливостях печінки лабораторних мишей та враховує загальноприйняті в патологічній практиці критерії ушкодження тканин печінки [131–133]. Для цього оцінюють 4 параметри ушкодження тканин печінки на гістологічному препараті, зафарбованому гематоксилін-еозином:

- ушкодження клітин;
- клітинну вакуоляризацію;
- інфільтрацію лейкоцитів;
- руйнування судин та/чи жовчних проток.

Кожному параметру присвоюють значення від 1 (норма) до 4 (найбільше ушкодження). Оцінку здійснює спеціаліст-гістолог, сертифікований в галузі лабораторної діагностики. Для кращої візуалізації ушкоджень тканин можна використовувати суму або добуток параметрів. Ми використали показник «індекс ушкодження печінки», рівний добутку чотирьох означених параметрів, для оцінки ушкодження тканин. Результати оцінки тканин печінки при СД та ВЛВХД наведені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Оцінка параметрів ушкодження тканин печінки за ВЛВХД

№	Тип дієти	Тривалість, тижнів	Ушкодження клітин	Клітинна вакуоляризація	Інфільтрація лейкоцитів	Руйнування судин та/чи проток	Сума індексів ушкодження печінки	Добуток індексів ушкодження печінки
1	СД	4	1	1	1	1	4	1
2	СД	4	1	1	2	1	5	2
3	СД	4	1	1	2	1	5	2
4	СД	4	1	1	1	1	4	1
5	СД	4	1	2	1	1	5	2
6	СД	4	1	1	2	1	5	2
7	СД	4	1	1	1	1	4	1
8	СД	4	1	1	2	1	5	2
9	ВЛВХД	4	3	2	3	2	10	36
10	ВЛВХД	4	2	3	3	3	11	54
11	ВЛВХД	4	2	2	3	2	9	24
12	ВЛВХД	4	2	3	3	1	9	18
13	ВЛВХД	4	1	2	2	2	7	8
14	ВЛВХД	4	1	3	2	2	8	12
15	ВЛВХД	4	2	3	3	3	11	54
16	ВЛВХД	4	3	4	3	1	11	36

Аналіз індексу ушкодження тканин печінки показав його достовірну відмінність ($p < 0.001$) між тваринами, що перебували на СД та ВЛВХД (рис. 3.13). У групі з ВФД також спостерігали достовірне зростання рівня інфільтрації лейкоцитів (не показано). Зважаючи на високу інформативність даного індексу ми використовували його і в наступних дослідках.

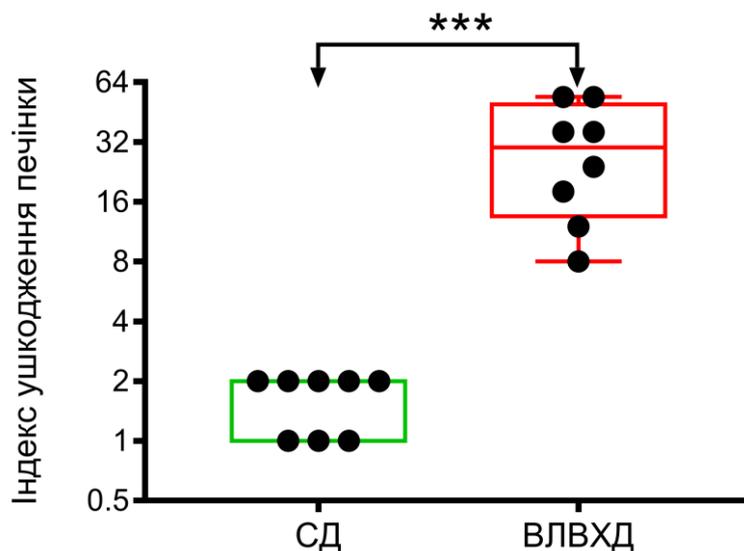


Рис. 3.13. Індекс ушкодження тканин печінки (добуток 4 параметрів ушкодження) при стандартній та високоліпідній високохолестериновій дієті, обчислений на основі аналізу гістологічних препаратів (як на рис. 3.9). Оцінку здійснювали як описано вище

Зважаючи, не лише на збільшення площі і накопичення ліпідів, притаманне обом типам досліджуваних дієт, а й на зростання лімфоцитарної інфільтрації в ділянках тканини навколо печінкових тріад (тобто ділянок, звідки кров надходить в тканини печінки), ми більш детально вивчили динаміку та природу цього явища в подальшому дослідженні.

3.1.3.1. Динаміка розвитку ушкоджень органів при ВЛВХД та ВФД. У наступному етапі роботи важливо було визначити динаміку змін тканин гепатобіліарної системи за ВЛВХД та ВФД, з метою встановлення часового проміжку, за якого можливий вплив на патологічні процеси. Оскільки ушкодження

печінки при ВЛВХД виявлялись гостріше, саме цей тип дієти був обраний для дослідження в динаміці.

Для досягнення цієї мети нами було використано 5 груп лабораторних мишей лінії C57BL6/N (по 5 тварин в групі), одна з яких перебувала на СД, а інші – на ВЛВХД упродовж різного часу, а саме 2, 3, 4 та 6 тижнів. Тварин кожної групи виводили з експерименту у зазначений час (СД – на 6 тижень) і здійснювали забір тканин та органів для подальшого аналізу. Схему експерименту зображено на рис. 3.14.

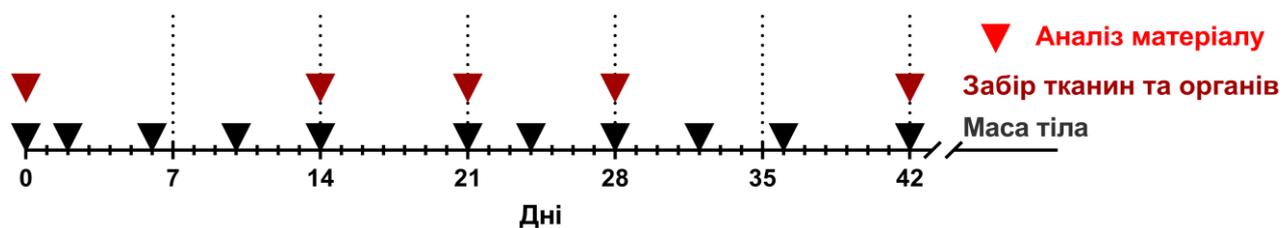


Рис. 3.14. Схема експерименту щодо визначення динаміки фізіологічних та патологічних змін у тварин за умов високоліпідної високохолестеринової дієти

В ході експерименту ми спостерігали зміни маси тіла та поведінки, подібні до таких в попередньому експерименті (тому ці дані не наводяться).

Для оцінки ушкоджень печінки в динаміці ВЛВХД було проаналізовано органи, відібрані на початку експерименту, на 2, 3, 4 та 6 тижні експерименту. Препарати було зафарбовано гематоксилін-еозином, здійснено їх мікрофотографування та визначено «індекс ушкодження печінки», як описано вище, на основі параметрів ушкодження клітин, вакуолізації клітин, інфільтрації лейкоцитів та руйнування судин.

Результати оцінки тканин печінки при СД та в динаміці розвитку ВЛВХД наведені в табл. 3.2.

Аналіз індексу ушкодження тканин печінки показав його зростання, починаючи з 2 тижня: середні значення індексу ушкодження тканин печінки на початку експерименту становили $1,6 \pm 0,25$ одиниць, на 2 тижень – $5,3 \pm 1,25$ одиниць, на 3 тижень – $10,0 \pm 1,27$, на 4 тижень – $44,0 \pm 8,37$ одиниць, на 6 тижень – $75,6 \pm 9,61$ одиниць. Значення індексу, починаючи з 3 тижня, були

достовірно відмінними ($p < 0.01$) від таких на початку експерименту. Зазначимо, що значне зростання відбувалось на 4 тиждень експерименту (рис. 3.15.)

Таблиця 3.2

Динаміка змін ушкоджень тканин печінки за умов ВЛВХД

№	Тип дієти	Тривалість, тижнів	Ушкодження клітин	Клітинна вакуолізація	Інфільтрація лейкоцитів	Руйнування судин та/чи проток	Сума індексів ушкодження печінки	Добуток індексів ушкодження печінки
1	СД	0	1	1	1	1	4	1
2	СД	0	1	1	2	1	5	2
3	СД	0	1	1	2	1	5	2
4	СД	0	1	1	1	1	4	1
5	СД	0	1	2	1	1	5	2
6	ВЛВХД	2	1	2	2	1	6	4
7	ВЛВХД	2	1	1	2	2	6	4
8	ВЛВХД	2	1	1	2	2	6	4
9	ВЛВХД	2	1	1	3	3	8	9
10	ВЛВХД	3	1	2	2	2	7	8
11	ВЛВХД	3	1	1	3	2	7	6
12	ВЛВХД	3	1	3	2	2	8	12
13	ВЛВХД	3	2	3	2	1	8	12
14	ВЛВХД	3	1	3	2	2	8	12
15	ВЛВХД	4	3	3	2	3	11	54
16	ВЛВХД	4	3	3	2	3	11	54
17	ВЛВХД	4	2	2	4	4	12	64
18	ВЛВХД	4	3	2	2	2	9	24
19	ВЛВХД	4	2	3	2	2	9	24
20	ВЛВХД	6	3	4	3	4	14	144
21	ВЛВХД	6	3	3	2	3	11	54
22	ВЛВХД	6	3	4	2	3	12	72
23	ВЛВХД	6	3	4	2	3	12	72
24	ВЛВХД	6	3	4	3	1	11	36

На основі отриманих нами даних було зроблено висновок, що починаючи з 4 тижня у тварин спостерігались значні ушкодження тканин печінки.

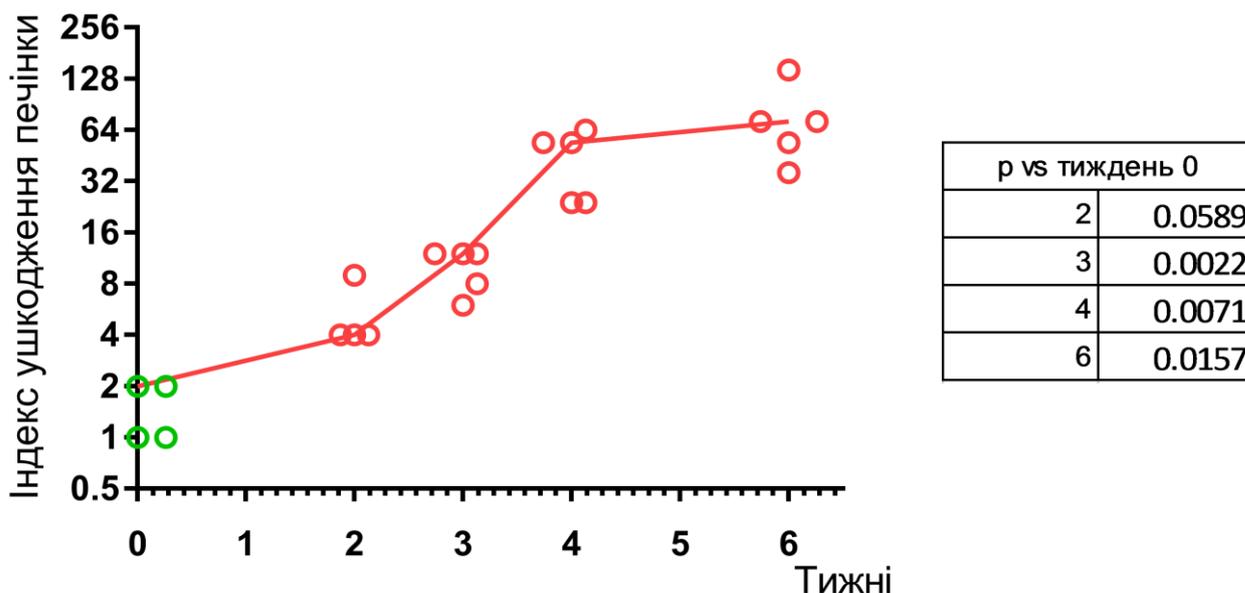


Рис. 3.15. Індекс ушкодження тканин печінки на різних етапах ВЛВХД. Значення в таблиці вказують на достовірність змін у визначений період часу щодо початку експерименту

З метою доказового підтвердження стетогепатиту та цирозу нами було досліджено колагенове переродження тканин печінки при ВЛВХД. Для виявлення ознак цирозу в тканинах печінки, зокрема заміщення функціональної тканини колагеновими волокнами, нами було відібрано метод фарбування пікриновою кислотою-тіазиновим червоним по Домагку. Цим методом були зафарбовані отримані раніше гістологічні препарати тканин печінки, заключені у парафінові блоки. Фарбування здійснювали за методикою, описаною в розділі 2.4.6. Всього було проаналізовано 24 препарати печінки на 2, 3, 4 та 6 тижні ВЛВХД. На рис. 3.16 представлені типові мікрофотографії тканин печінки на зазначених етапах ВЛВХД. На ранніх етапах ВЛВХД (2, 3 тижні) колагенові волокна виявляли лише в складі судин у тріадах печінки чи/та центральних венах часточок печінки. Та вже на 4 тиждень тканина набувала пурпурного відтінку через накопичення колагенових волокон та компонентів проколагену. Ці зміни ставали більш вираженими на 6 тиждень ВЛВХД.

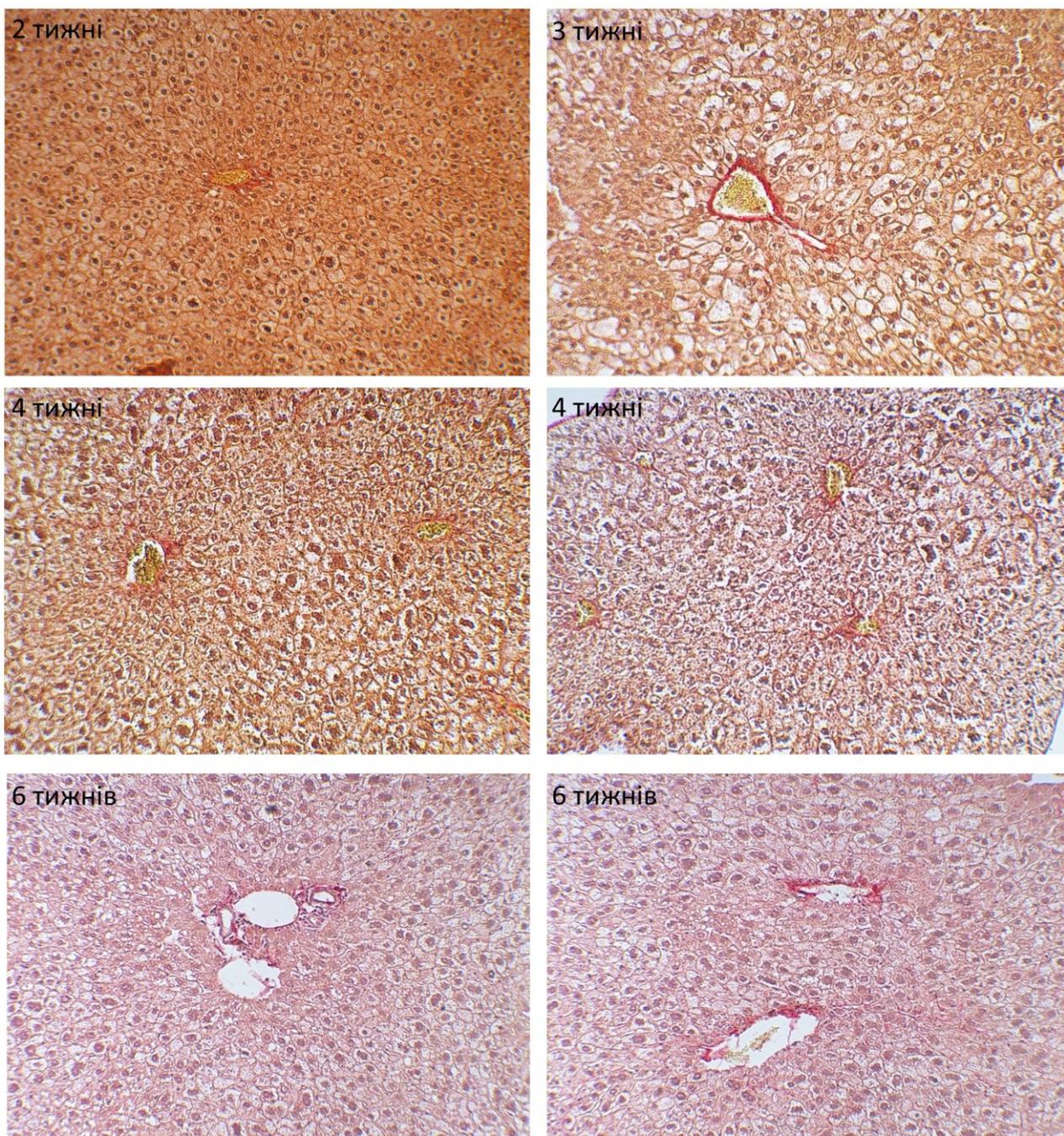


Рис. 3.16. Утворення колагенових волокон (пурпурний колір) у тканинах печінки тварин при ВЛВХД (пурпурний колір). Фарбування пікриновою кислотою-тіазиновим червоним по Домагку. Колагенові волокна виявляються на 4-6 тижні ВЛВХД. Масштаб усіх елементів фото є однаковим. Об'єктив 20х.

Отже, значні ушкодження печінки, спричинені ВЛВХД у мишей лінії C57BL6/N спостерігалися вже після 4 тижнів перебування на спеціальному високохолестериновому кормі, про що свідчили результати морфологічного аналізу тканин печінки, оцінка ушкодження клітин, їх вакуоляризація, інфільтрація лейкоцитів, ушкодження судин та проток, а також накопичення колагенових волокон. Гістологічно підтверджено НАСГ у використаній моделі.

3.1.3.2. Спосіб дискримінації нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів у гістологічних зразках. Важливим завданням було вивчити природу лейкоцитарної інфільтрації в клітинах печінки.

Хоч морфологічний аналіз за формою ядер у патологічній практиці використовується як рутинна ознака для ідентифікації нейтрофільних гранулоцитів, проте, щоб виключити наявність еозинофільних гранулоцитів із схожою сегментованою формою ядра, ми запропонували використовувати флуоресцентний метод детекції. Для цього ми поєднали виявлення еозинофільних гранул за фарбуванням аніліновим синім (АВ) з флуоресцентною системою детекції, адже АВ володіє флуоресценцією в синій ділянці спектру (440 нм), а еозинофільні гранули при фарбуванні ним виявляють інфрачервоний метакроматичний сигнал при 700 нм. Цей підхід дозволив додатково виявити ядро клітини при фарбуванні пропідій йодидом (PI) та специфічні маркери еозинофілів, наприклад, рецептори IgE, при використанні мічених флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) антитіл (рис. 3.17, А, Б). За допомогою флуоресцентної мікроскопії високої роздільної здатності та використання методів деконволюції при пост-обробці зображень вдалось отримати роздільну здатність зображень, достатню для виявлення окремих еозинофільних гранул (рис. 3.17, В).

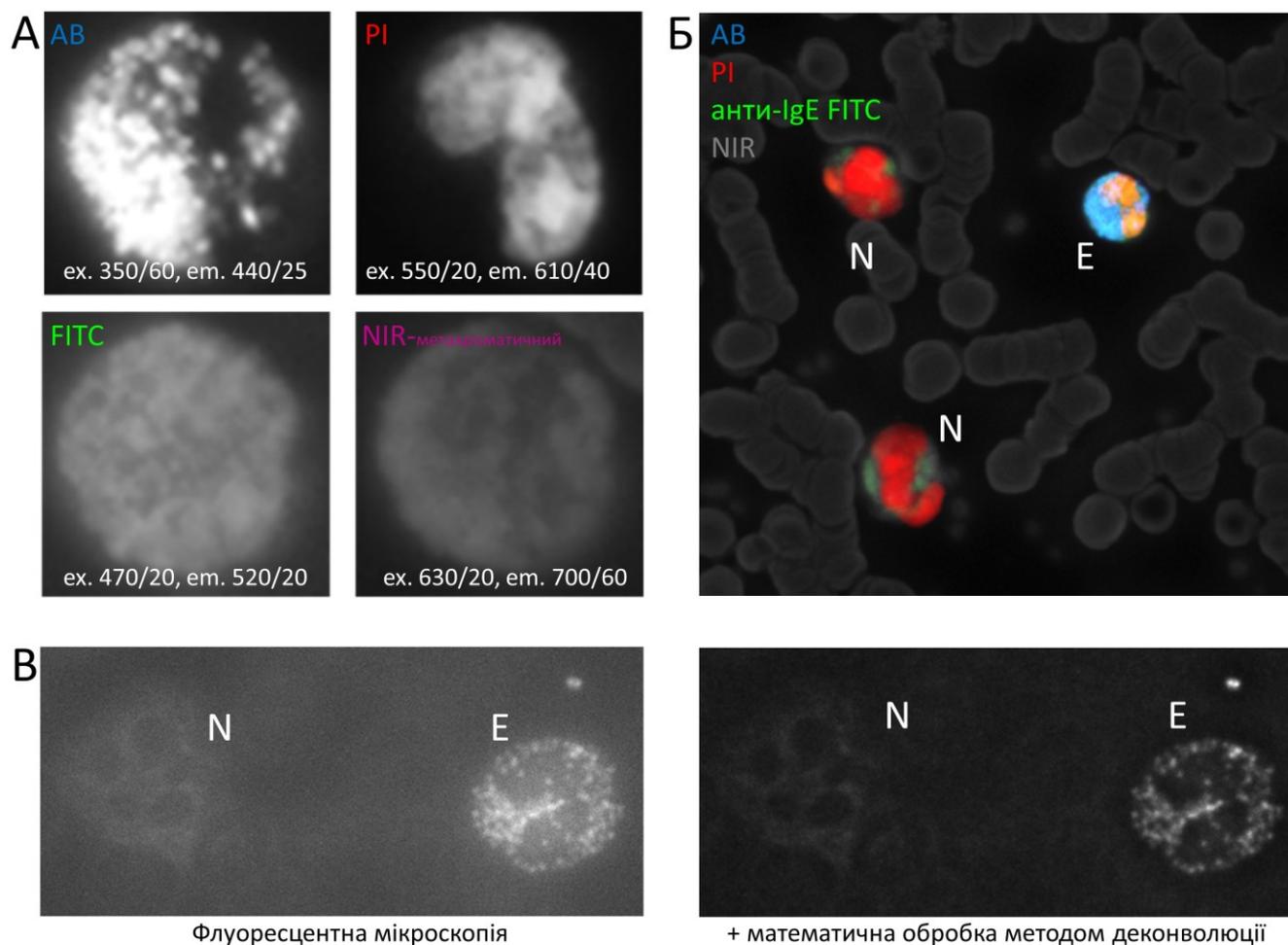


Рис. 3.17. Дискримінація еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитів за допомогою флуоресцентної мікроскопії. А – флуоресценція анілінового синього (AB) для виявлення еозинофільних гранул, пропідій йодиду (PI) для виявлення ДНК, FITC, як мітки антитіл – в даному випадку IgE та інфрачервоного метакроматичного сигналу (NIR), що утворюється при взаємодії AB та еозинофільних гранул. Числами вказано використані довжини хвиль збудження (ex.) та емісії (em.), об’єктив 60x 1,3NA. Б – комбіноване зображення із використанням описаних міток дозволяє чітко дискримінувати еозинофільні (E) та нейтрофільні (N) гранулоцити. Поєднання синього кольору AB та зеленого FITC надає блакитний відтінок, об’єктив 40x 0,95NA. В – використання флуоресценції AB для дискримінації еозинофільних (E) та нейтрофільних (N) гранулоцитів за наявності специфічних гранул. Об’єктив 60x 1,3NA водна імерсія.

Поєднання флуоресценції еозинофільних гранул при 440 нм та метакроматичного флуоресцентного сигналу при 700 нм дозволило нам візуалізувати еозинофільні гранули у гістологічних зразках [134] та забезпечило надійну дискримінацію нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів.

Розроблений нами метод візуалізації можна запропонувати як новий спосіб виявлення нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів. Метод описано в роботах [134, 135] і успішно застосовано для виявлення еозинофільних гранулоцитів, задіяних в розвитку алергії до коров'ячого молока в дітей (додаток А.4).

3.1.3.3. Інфільтрація тканин печінки гранулоцитами за ВЛВХД.

Запропонований метод дискримінації нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів ми використали для ідентифікації популяції лейкоцитів із сегментованим ядром, які виявлялись як інфільтрат у тканинах печінки поблизу печінкових триад за ВЛВХД та ВФД. Досліджувані зразки печінки після 4 тижнів на ВЛВХД (рис. 3.18, ліворуч та по центрі) та при ВФД (рис. 3.18, праворуч) були зафарбовані АВ для виявлення еозинофільних гранулоцитів та РІ для виявлення морфології ядер. Ядра гепатоцитів на рисунку чітко виділяються як великі структури з видимим еу- та гетерохроматином, ядра клітин Іто (зірчасті клітини, печінкові ліпоцити) видовжені, а ядра гранулоцитів щільні (яскраві за фарбуванням РІ) та конденсовані. При цьому ми спостерігали лише кілька клітин, що виявляли фарбування гранул з АВ, притаманне еозинофільним гранулоцитам.

Отже, більшість лейкоцитів з сегментованим ядром, що виявлялась в інфільтратах поблизу ділянок печінкових триад при ВЛВХД та ВФД, були ідентифіковані як нейтрофільні гранулоцити (рис. 3.18).

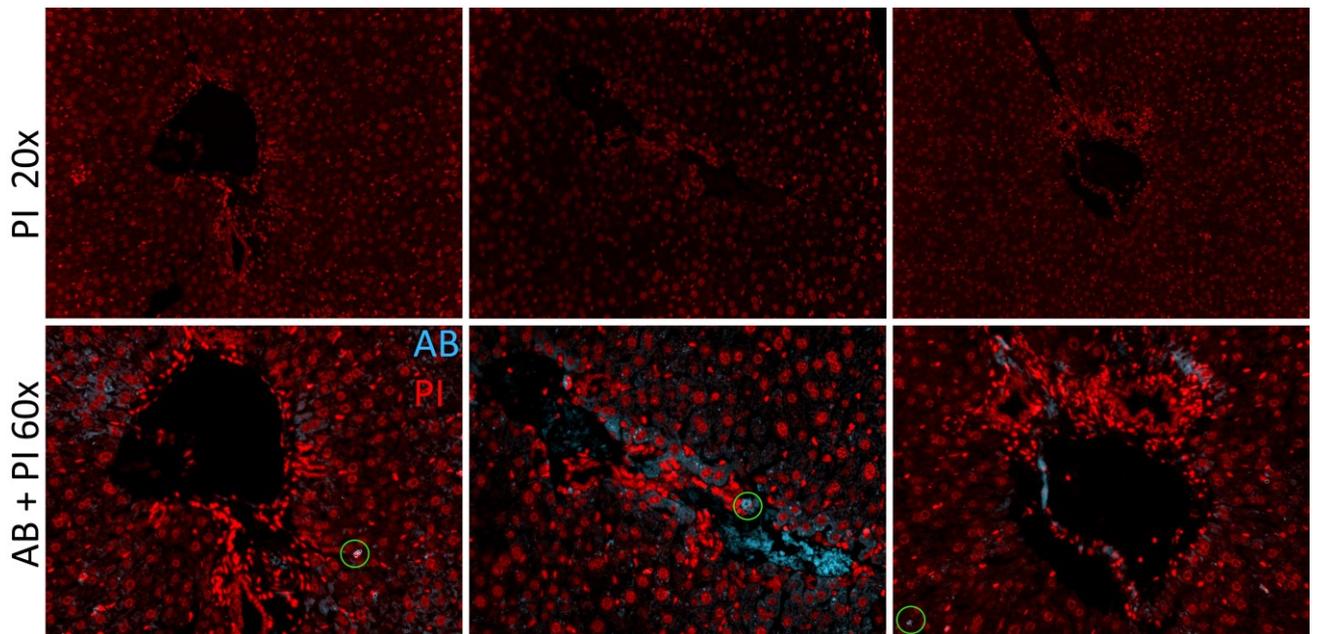


Рис. 3.18. Лейкоцитарна інфільтрація навколо печінкових триад не містить еозинофільних гранулоцитів. Флуоресцентна мікроскопія зрізів печінки за ВЛВХД (ліворуч, центр) та ВФД (праворуч) виявляє значну кількість лейкоцитів, серед яких багато із сегментованим ядром. Серед цих клітин лише поодинокі (виділені зеленим) виявляють АВ-позитивні гранули (сині), притаманні еозинофілам. Ядра зафарбовані PI, об'єктив 60x 0,9NA.

3.1.4. Утворення НПП у гепатобіліарній системі за ВЛВХД та ВФД. При дослідженні літогенних дієт важливе значення має комплексне спостереження за зміною інших органів тварин і, зокрема, жовчних міхурів. У більшості тварин за ВЛВХД спостерігали гіпертрофію жовчних міхурів (рис. 3.19). За даними різних експериментів, у близько половини тварин спостерігалось утворення каменів, видимих на мікрофотографії жовчних міхурів (діаметром до 3 мм) на 42 день ВЛВХД, із більшенням їх кількості на 6 тиждень. Водночас у контрольній групі та у тварин на ВФД такі зміни не спостерігались. На рис. 3.19 представлені типові мікрофотографії жовчних міхурів окремих тварин, а також камені, отримані після розтину міхурів.



Рис. 3.19. Утворення каменів у жовчному міхурі при СД, ВЛВХД та ВФД. Наведені фото (1-6) каменів у жовчному міхурі окремих тварин кожної з груп. Масштаб усіх елементів фото є однаковим

Окрім твердих і оптично щільних каменів у вмісті жовчних міхурів також виявлялись гелеподібні структури. Ми здійснили їх аналіз за допомогою поляризаційної мікроскопії високої роздільної здатності і виявили оптично заломлюючі кристали кубічної форми, що притаманні холестерину. Розмір кристалів сягав від кількох до кількох десятків мікрометрів (рис. 3.20).

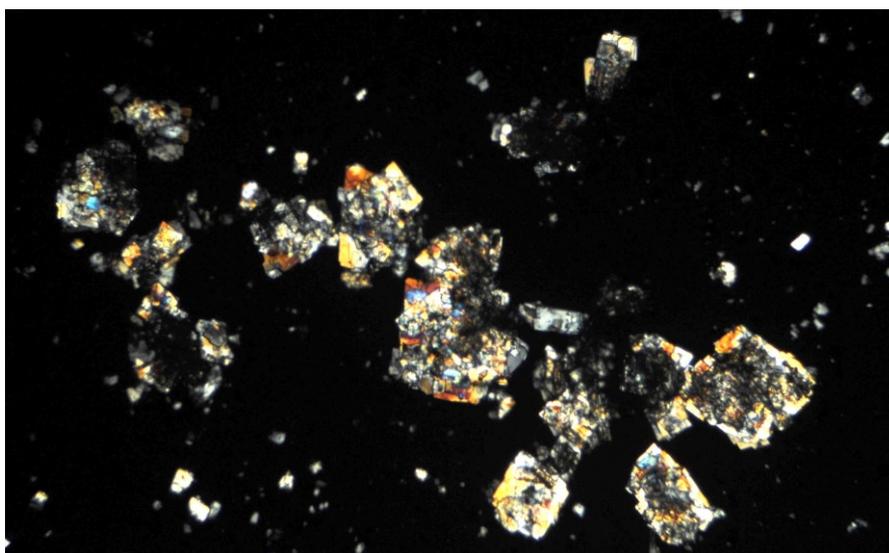


Рис. 3.20. Поляризаційна мікроскопія гелеподібного вмісту жовчних міхурів при ВЛВХД

Можливість виявляти кристали холестерину за поляризаційним світлом за допомогою поляризаційної мікроскопії спонукало нас розробити підхід, що використовувався в наступних повторах експерименту, коли жовчні міхури переносились в ємність для цитоспінових мазків, розрізались і їх вміст кількісно переносився на скельця, осаджувався та мікрофотографувався. Вміст жовчних міхурів ми промивали забуференим фізрозчином та досліджували під інвертованим мікроскопом, обладнаним поляризаційною оптикою (фільтри Polaroid CPF 52 та CPF 69).

Порівняння вмісту жовчних міхурів при СД, ВЛВХД та ВФД показало значне накопичення кристалів холестерину лише у тварин із ВЛВХД (рис. 3.21), у тварин на ВФД помітної різниці у кількості поляризуючих частинок при аналізі поляризаційною мікроскопією не виявлено (не показано).

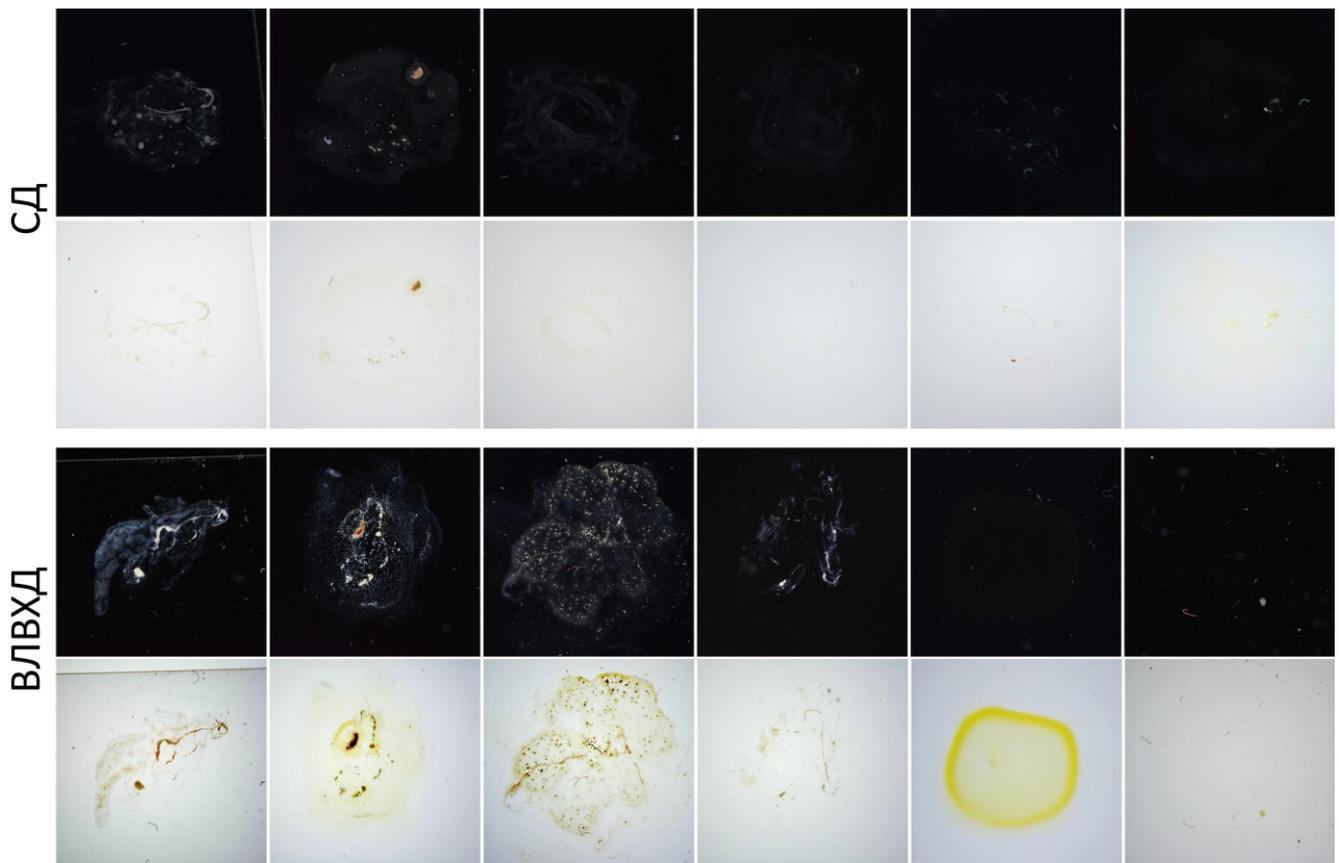


Рис. 3.21. Поляризаційна мікроскопія гелеподібного вмісту жовчних міхурів при ВЛВХД та СД. Верхній ряд – поляризаційна мікроскопія, нижній ряд – світлова мікроскопія зразка

При ВЛВХД також виявлено велику кількість уже кальцифікованих кристалів у жовчних міхурах, про що свідчить наявність оптично щільних часточок при спостереженні світловою мікроскопією.

Аналіз вмісту жовчних міхурів, кількісно перенесений на високоадгезивні предметні скла (для уникнення втрат матеріалу), з наступною фіксацією, фарбуванням пропідію йодидом з подальшим аналізом флуоресцентною мікроскопією вказує на наявність клітин лейкоцитарного типу з переважанням нейтрофільної морфології ядра в усіх досліджуваних зразках. За умов стандартного раціону ми спостерігали ядра лише з незначними ознаками деконденсації ДНК, водночас за умов ВФД спостерігались утворені довгі тяжі ДНК – типова ознака нейтрофільних позаклітинних пасток [136], – як в окремих клітинах, так і в їх агломератах. Вважається, що за умов активації нейтрофільних гранулоцитів вони викидають «хмари» ДНК, які згодом, при контакті з іншими нитками ДНК, агрегують, утворюючи агреговані НПП [136]. Спостережувані нами агрегати із вмістом позаклітинної ДНК та ще не деконденсованих ядер в матеріалі, виділеному із жовчних міхурів тварин на ВЛВХД добре підтверджують їх роль в ініціації патологічних запальних процесів у жовчних протоках (рис. 3.22).

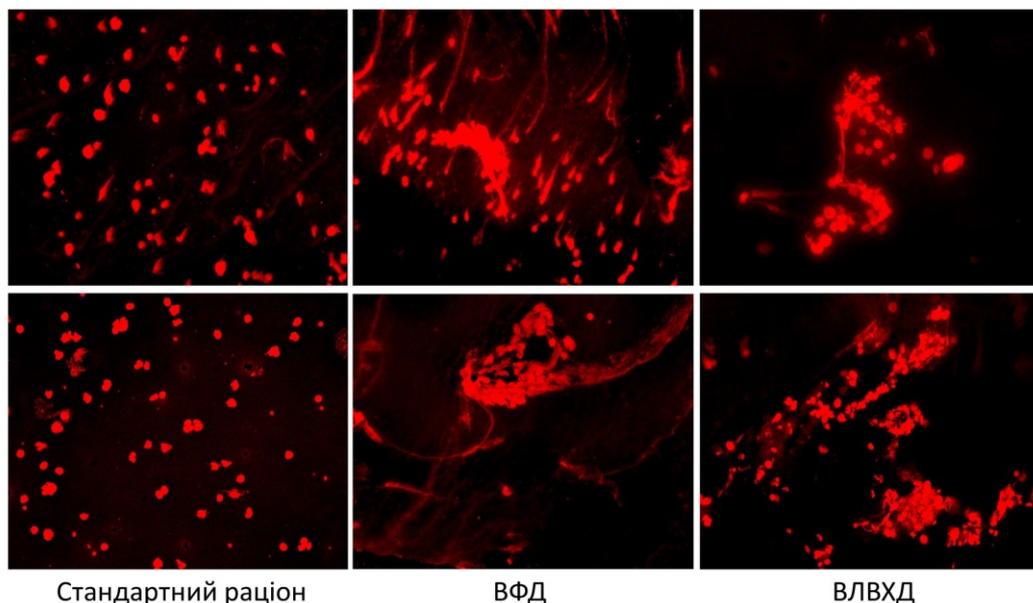


Рис. 3.22. Результати флуоресцентної мікроскопії вмісту жовчних міхурів лабораторних мишей лінії C57BL6/N на різних типах раціонів. Представлено типові фото для кожної із груп. За умов ВФД та ВЛВХД спостерігали утворення НПП та їх наступну агрегацію. Фарбування РІ, об'єктив 60x 0,9NA.

Для оцінки наявності клітинних компонентів у вмісті жовчних міхурів ми зафарбовували окремі кристали флуоресцентним барвником пропідій йодидом, який фарбує ДНК. Для цього кристали поміщали в розчин пропідій йодиду, 1 мкг/мл, на 10 хв. Препарати аналізували на флуоресцентному мікроскопі Olympus BX51.

Нами було виявлено вміст клітинних компонентів на поверхні кристалів, морфологія ядра клітин нагадувала таку у нейтрофілів. Також було виявлено тяжі ДНК – позаклітинні нейтрофільні пастки (рис. 3.23, А-В). При цьому ми спостерігали флуоресценцію холестерину в діапазоні 510-540 нм при збудженні світлом 470-490 нм (рис. 3.23, Б, В).

Щоб більш детально проаналізувати вміст мікрокристалів, ми нанесли кристали на предметне скельце і розчинили (вимили) їх вміст за допомогою ацетону. Отриманий матеріал проаналізували за допомогою імуногістохімічного фарбування із виявленням пропідію йодиду для виявлення ДНК (червоний) та антитіл до нейтрофільної еластази для виявлення компонентів нейтрофільних гранулоцитів (зелений сигнал). В дослідженні використовували описаний метод фарбування [5] (рис. 3.23, Г).

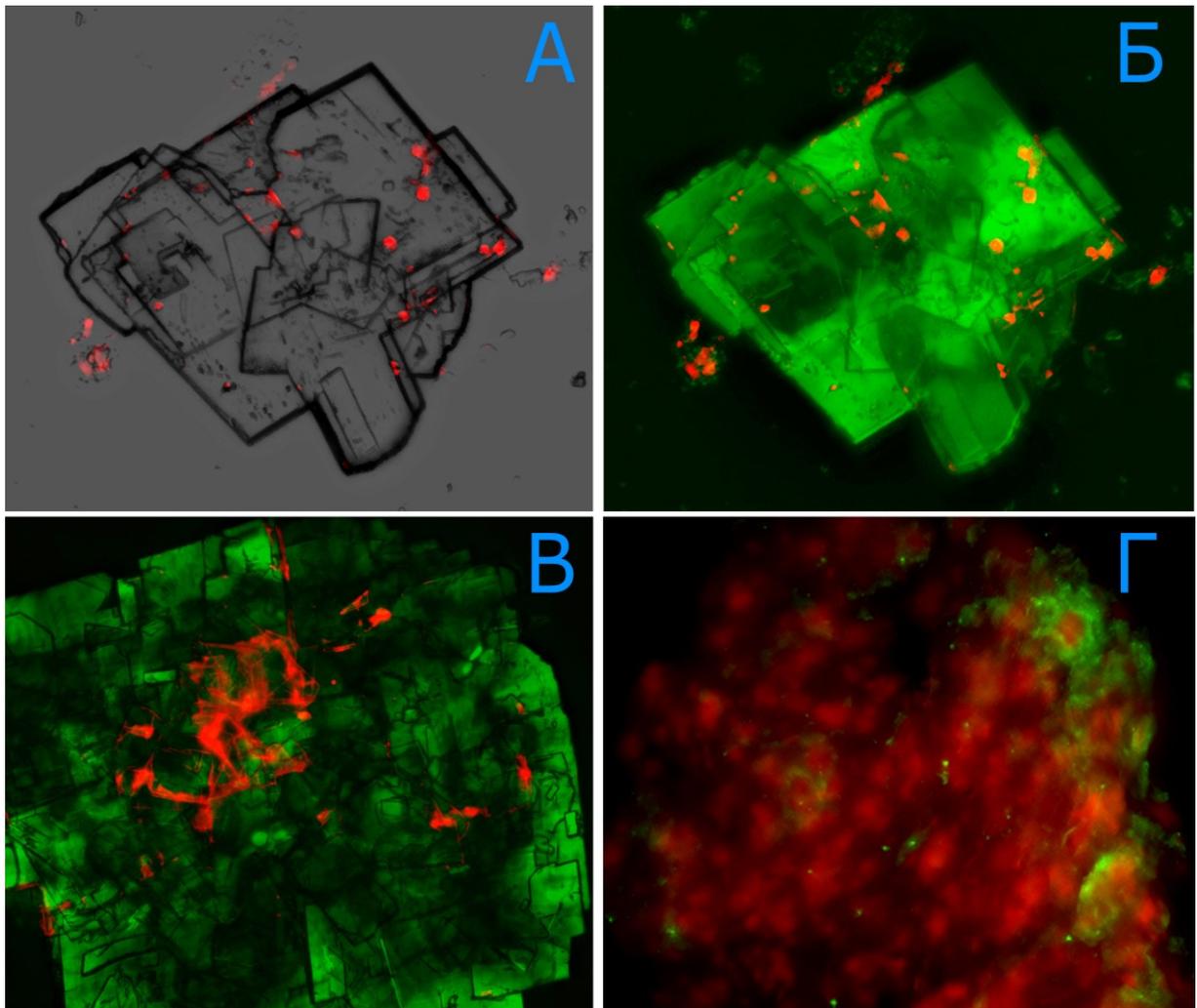


Рис. 3.23. Нейтрофіли та їх компоненти присутні на кристалах холестерину. А – світлова мікроскопія із суперпозицією сигналу пропідій йодиду. Б, В – флуоресцентна мікроскопія, зелений канал – флуоресценція кристалів холестерину, червоний – флуоресценція пропідій йодиду після зв’язування з ДНК. А і Б відображають один кристал. Г – аналіз вмісту мікрочастинки за допомогою пропідій йодиду (червоний канал) та антитіл до нейтрофільної еластази (зелений канал), Об’єктив 60x 0,9NA.

Використання флуоресцентної мікроскопії високої роздільної здатності дозволило нам виявити мікрочастинки холестерину, які були оточені нитками ДНК та нейтрофільними гранулоцитами, що їх викидали в процесі утворення НПП. В такий спосіб ми отримали кадри безпосередньої взаємодії нейтрофільних гранулоцитів, НПП та мікрочастинки холестерину *in vivo* у просторі жовчних

міхурів мишей на ВЛВХД (рис. 3.24) [137–140], фото НПП також були опубліковані на обкладинці журналу Медичної науки, Праці НТШ (додаток В).

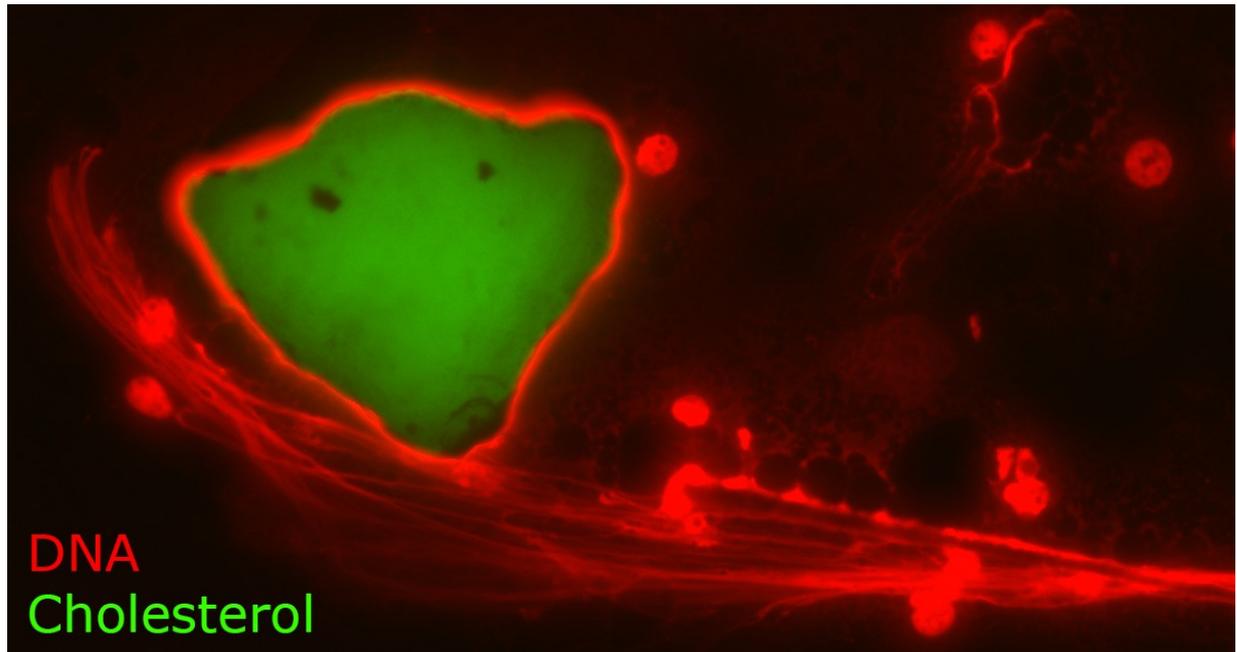


Рис. 3.24. Нитки ДНК, що екстерналізуються нейтрофілами, оточують кристали холестерину. ДНК зафарбована пропідій йодидом (червоне забарвлення), холестерин – автофлуоресцією (зелене забарвлення). Округлі об'єкти є ядрами нейтрофільних гранулоцитів. Об'єктив 60x 0,9NA.

3.1.4.1. Взаємодії нейтрофільних гранулоцитів з мікрочастинками холестерину в моделі стерильної повітряної кишені. Щоб продемонструвати, що саме мікрочастинки холестерину є індукторами утворення НПП ми використали модель повітряної кишені у мишей (детально описано в розділі 3.2) [141]. В стерильно сформовану повітряну кишеню миші, яка протягом 5 днів інфільтрувалась лейкоцитами ми вводили 3 мг мікрокристалів холестерину. Холестерин використовували хімічно чистий (99,9 %, Sigma Aldrich). Через одну добу вміст повітряної кишені вимивали, фарбували щодо вмісту екстерналізованої ДНК пропідій йодидом та досліджували за допомогою методів флуоресцентної мікроскопії високої роздільної здатності поєднаної з поляризаційною мікроскопією. Ми спостерігали, що за добу перебування в повітряній кишені кристали холестерину, які виявляли поляризаційною мікроскопією, вкривались молекулами екстерналізованої ДНК, яку виявляли за флуоресценцією PI. Клітини з

нейтрофільною морфологією ядра були тісно асоційовані з агрегатами холестерину-ДНК (рис. 3.25).

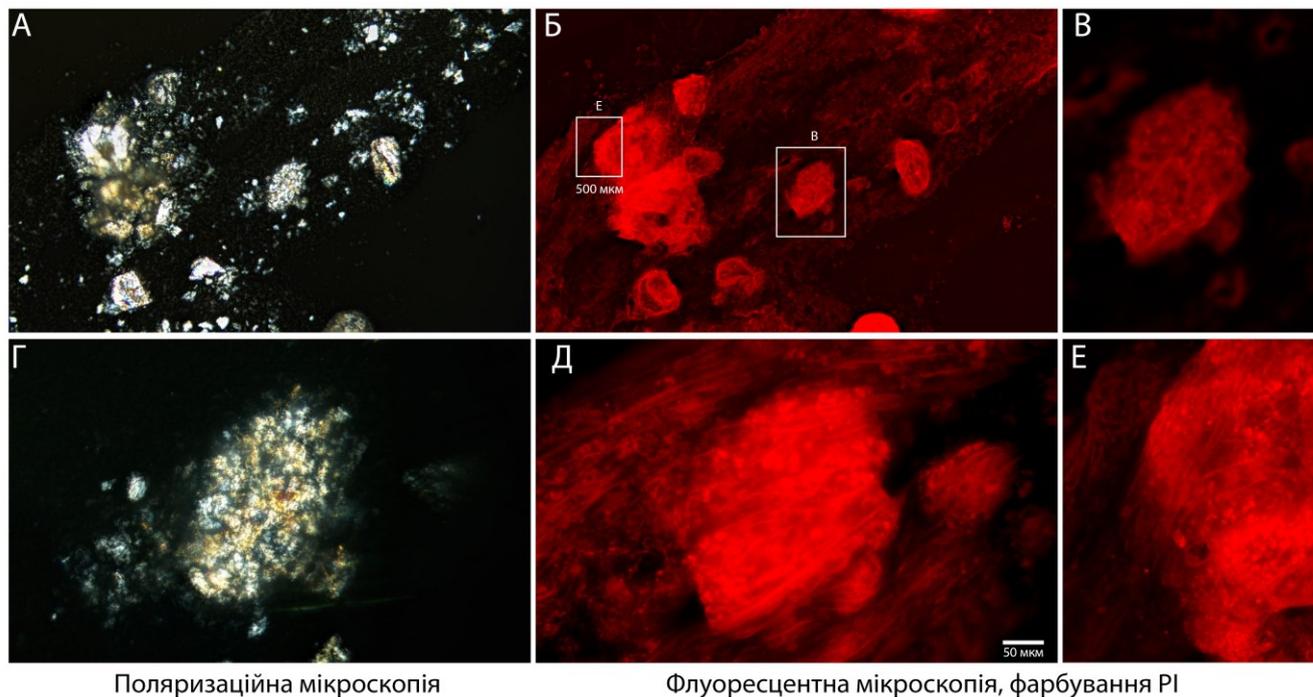


Рис. 3.25. Кристали холестерину, введені та забрані із повітряної кишені миші. ДНК зафарбована пропідій йодидом (червоний, Б, В, Д, Е), холестерин виявляє свічення в поляризаційному режимі (А, Г). А-Б та Г-Д є парними зображеннями окремих полів зору у поляризаційному та флуоресцентному режимах досліджень, відповідно. В, Е – збільшені ділянки, вказані на Б. Видно окремі нитки ДНК на поверхні кристалів холестерину. Об'єктив 60x 0,9NA.

В такий спосіб, ми ініціювали утворення НПП на поверхні штучних кристалічних утворень холестерину, ввівши їх у повітряну кишеню, створену в мишей, – у ділянку, де природнім чином зростає концентрація нейтрофільних гранулоцитів.

3.1.5. Системні запальні реакції при ВЛВХД

3.1.5.1. Зміни вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові при ВЛВХД. Зростання вмісту протеїну в крові свідчить про наявність запальних процесів в організмі та ушкодження нирок. Добре відомо, що вміст циркулюючих

імунних комплексів значно зростає при запальних процесах, а при таких патологіях, як системний червоний вовчак, відкладення циркулюючих імунних комплексів в нирках призводить закупорки фільтрувальних каналців, гломерулонефриту та є основним чинником відмови нирок при системному червоному вовчаку [142].

Основою імунних комплексів є молекули імуноглобулінів IgG (з молекулярною масою 150 кДа) та молекули імуноглобуліну IgM (з молекулярною масою близько 1 мДа, у миші та у людини є пентамером, тобто може зв'язувати до 5 молекул IgG), які внаслідок крос-реактивності взаємодіють між собою, з білками комплементу та іншими компонентами крові. Зазвичай циркулюючі імунні комплекси визначають в крові турбідиметричним методом [142], проте зважаючи на кількість біоматеріалу, цей метод є малоприматним для дослідження сироватки крові тварин.

Тому, для визначення вмісту IgG-IgM комплексів у мікрокількостях замороженої сироватки крові, а також визначення інших властивостей таких комплексів, зокрема глікозилювання, нами раніше було розроблено метод імуноферментного аналізу [115].

Схема запропонованого імуноферментного аналізу представлена на рис. 3.26, А. Основою аналізу є захоплення імунних комплексів за допомогою F(ab)₂ фрагментів, сорбованих на поверхню імуноферментного планшету, після чого визначають вміст зв'язаних імунних комплексів шляхом детекції вмісту антитіл типу IgM. Таким чином, лише наявність імунного комплексу, який містить молекули IgG зв'язані з IgM, призводить до виявлення позитивного сигналу.

Аналіз зразків сироваток крові мишей, що перебували 4 тижні на СД та ВЛВХД, показує на значне збільшення рівня комплексів IgG-IgM ($p < 0.01$), як це показано на рис. 3.26, Б. Комплекси IgG-IgM відображають лише незначну частину усіх можливих імунних комплексів у сироватці.

Запропонований метод їх виявлення не ускладнюється тим фактом, що великі імунні комплекси при заморозці можуть випадати в осад (явище відоме як «кріоглобуліни») чи руйнуватися. Отримані результати добре узгоджуються з

даними щодо вмісту білка в сироватці тварин та свідчать про ушкодження нирок внаслідок виникнення запальних процесів при ВЛВХД.

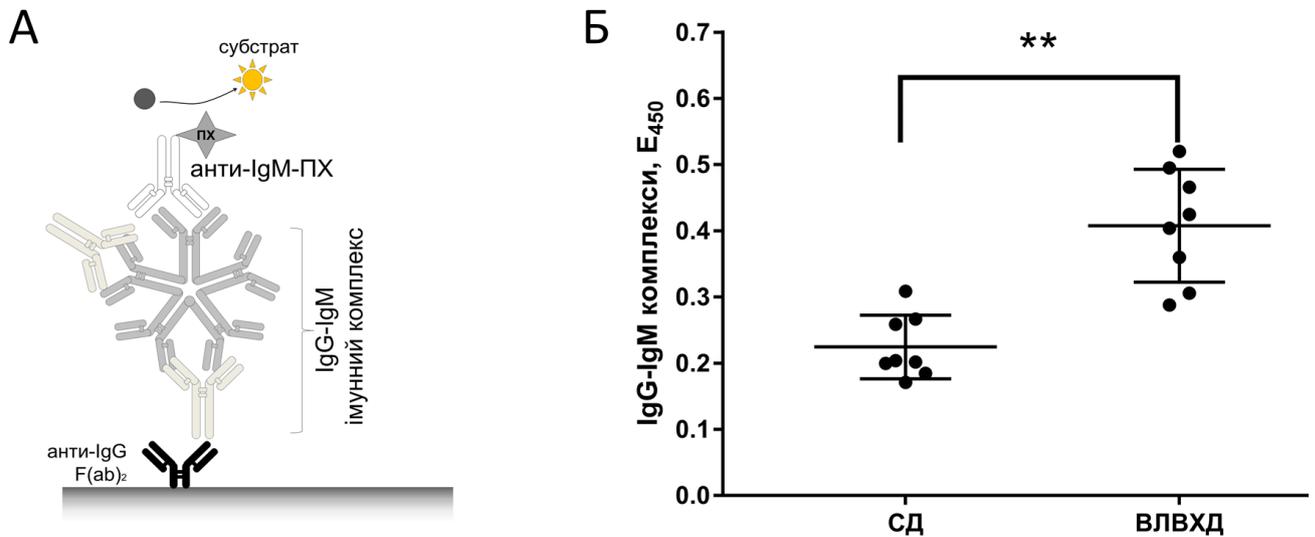


Рис. 3.26. Вміст комплексів IgG-IgM у зразках крові мишей досліджуваних груп на стандартній та високоліпідній високохолестериновій дієті. А – принцип запропонованого нами методу імуноферментного аналізу для виявлення комплексів молекул IgG-IgM у мікрокількостях зразків сироватки [115]. Б – вміст імуних комплексів після 4 тижнів ВЛВХД

Аналіз зразків сироваток крові мишей в ході ВЛВХД показав значне збільшення рівня комплексів IgG-IgM ($p < 0.05$), починаючи з 21 дня перебування на дієті, як це показано на рис. 3.27. Цей показник динамічно збільшувався в ході ВЛВХД, зокрема на початку експерименту він становив: $0,2238 \pm 0,00826$ одиниць поглинання, на 2 тиждень – $0,245 \pm 0,03039$, на 3 тиждень – $0,3052 \pm 0,03194$, на 4 тиждень – $34,20511 \pm 14,15136$, на 6 тиждень – $0,4258 \pm 0,03509$.

Отримані часові дані добре узгоджуються із нашими результатами дослідження ушкодження печінки та свідчать про ушкодження нирок внаслідок виникнення запальних процесів при ВЛВХД, починаючи з 3 – 4 тижня перебування тварин на ВЛВХД.

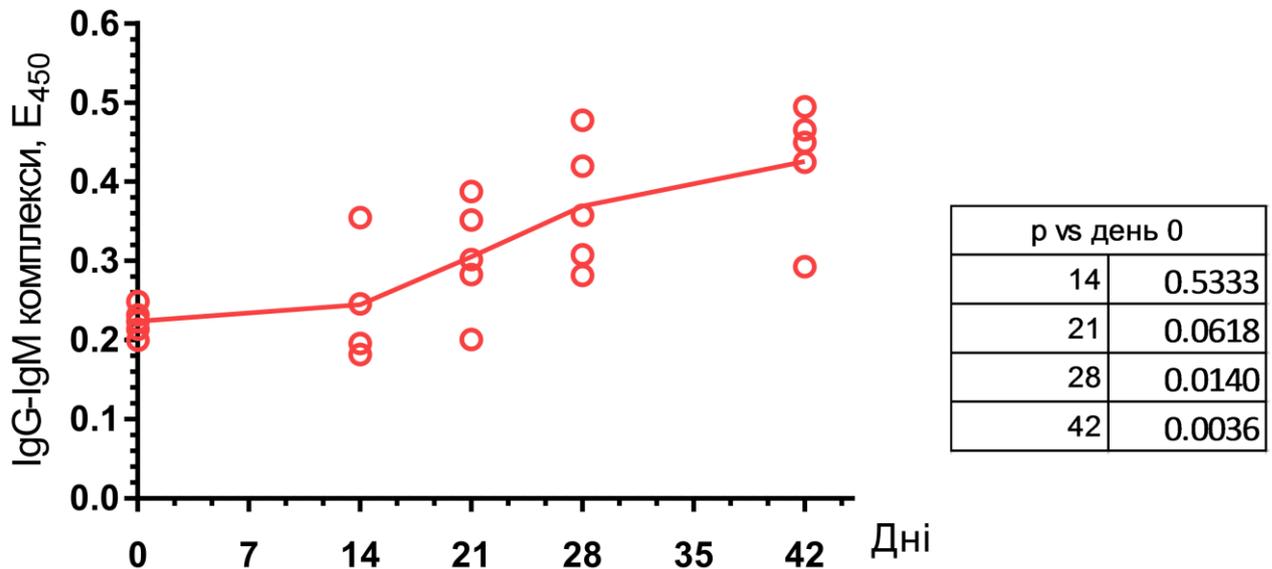


Рис. 3.27. Вміст комплексів IgG-IgM у зразках крові досліджуваних мишей на різних етапах перебування тварин на ВЛВХД. Детекція за допомогою методу імуноферментного аналізу. Значення в таблиці вказують на достовірність змін у визначений період часу щодо початку експерименту

3.1.5.2. Зміни глікозилювання молекул IgG у сироватці крові при ВЛВХД та ВФД. Іншим важливим маркером системного запалення, який можна виявляти у лабораторних мишей, використовуючи мікрокількості сироватки, і на який не впливають процеси лізису крові при заборі – це зміна глікозилювання молекул імуноглобуліну IgG. Річ у тім, що молекула імуноглобуліну типу IgG у кожному з двох ланцюгів Fc-ділянки в положенні Asn-297 містить молекулу N-глікану (рис. 3.28, А). Оскільки ланцюги розташовуються поруч, то глікани фактично направлені один до одного, і термінальні залишки сіалових кислот гліканів взаємовідштовхуючись впливають на просторову конформацію Fc-ділянки.

Останнє явище визначає афінність антитіл до різних типів імуноглобулінових рецепторів FcγR на ефektorних клітинах. Ці рецептори викликають про- та антизапальну реакцію і володіють різною спорідненістю до антитіл з різними глікоформами [143]. Таким чином, експонування гліканів на молекулі IgG визначає про- чи антизапальні ефекти антитіл. Це стосується і аутоантитіл.

Було описано, що рівень сіалування імуноглобуліну має вирішальний вплив на їх прозапальну чи протизапальну активність [143]. Водночас експонування фукозильних залишків в корі глікану зазвичай є маркером системних запальних процесів [144, 145]. Рівень експресії фукозильних залишків значно вищий у пацієнтів із СЧВ відносно здорових донорів. Крім того, активність захворювання позитивно корелює із наявністю фукозильних залишків на іммобілізованих IgG комплексах [146]. А галактозильовані форми IgG (IgG-G0) значно підвищені у пацієнтів із ревматоїдним артритом і позитивно корелюють з активністю захворювання [147]. Більше того, високі рівні цих глікоформ IgG у сироватці крові асоціюються із різними автоімунними захворюваннями, у тому числі хворобою Крона, ювенільним ревматоїдним артритом, СЧВ, туберкульозом [148–150].

Для виявлення експонування фукозильованих форм використовують лектин AAL [144], також для цього розроблений метод лектин-імуноферментного аналізу, що дозволяє проводити кількісну оцінку залишків гліканів нормалізованих щодо рівня IgG в сироватці [108]. Саме цей спосіб було використано нами в роботі для оцінки рівня глікозилювання IgG у мишей за СД та ВЛВХД та ВФД.

Згідно запропонованої методики, ми аналізували експонування корових фукозильних залишків у складі N-глікану з використанням лектину LCA, який виявляє коровий фукозильний залишок в складі GlcNAc-GlcNAc-Man-(Man)₂ та лектину AAL, який виявляє суто коровий фукозильний залишок, приєднаний до N-глюкозаміну N-глікану. Антитіла виявляли лектин-імуноферментним аналізом з використанням F(ab)₂ фрагментів для «захоплення» досліджуваних молекул імуноглобуліну з сироватки. Схему дослідження наведено на рис. 3.28, А. Паралельно визначали рівень IgG в сироватці, нормалізували сигнал фукозильних залишків на одиницю вмісту IgG, як показано на рис. 3.28, Б та В. Спостерігали зростання рівня експонування залишків, які виявлялись як лектином LCA (рис. 3.28, Б, $p < 0.0001$), так і лектином AAL (рис. 3.28, В, $p < 0.0001$). Незначне зростання експонування фукозильних залишків спостерігали і при ВФД, проте ці зміни не були достовірними (не показано).

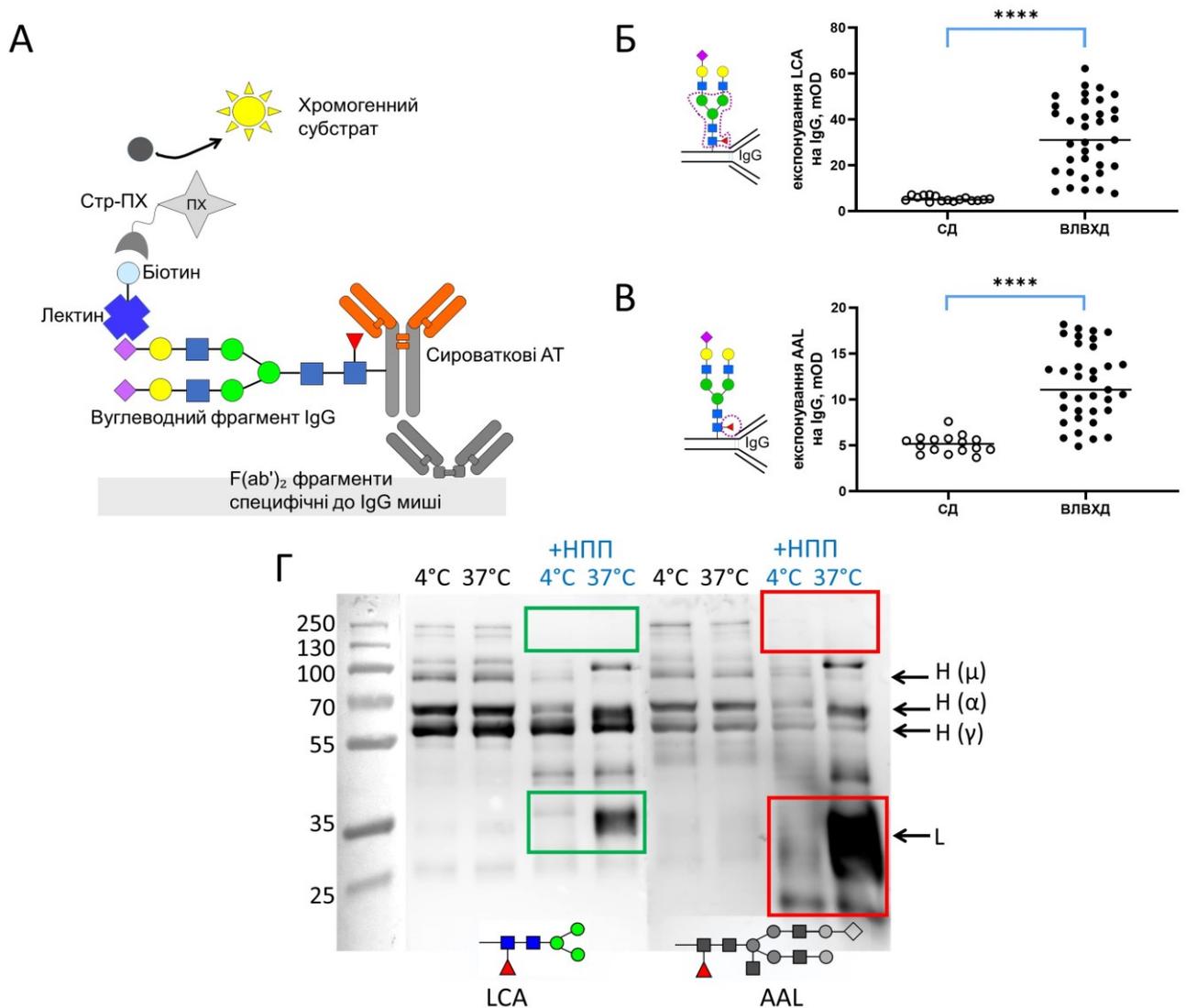


Рис. 3.28. Вміст фукозильних залишків на молекулах IgG у зразках крові мишей досліджуваних груп ВЛВХД. А – принцип використаного методу лектин-імуноферментного аналізу (див. Матеріали і методи). Б – експонування фукозильних залишків у складі кору N-глікану, детекція лектином LCA. В – експонування фукозильних залишків у складі кору N-глікану, детекція лектином AAL. Ділянки розпізнавання вуглеводів у складі молекули N-глікану у складі IgG виділені пунктиром. Г – лектиноблот зразків сироватки проінкубованих за зазначеної температури із НПП, отриманими з 40×10^6 нейтрофілів *ex vivo*, розділених PAGE та детектованих за допомогою зазначених лектинів, мічених біотином

На наступному етапі ми виділили 40×10^6 нейтрофілів периферичної венозної крові людини та індукували з них НПП за методикою [25] та проінкубували з

100 мл сироватки крові упродовж 96 год за температури 4 та 37°C. Білки розділили електрофорезом та провели лектино-блок аналіз за методом [151] з використанням тих же лектинів, що й для ІФА, зокрема LCA та AAL. За дії НПП при 37°C ми спостерігали зростання білкових смуг з ММ близько 35 кДА, багатих на корові фукозилзовані глікани та на фукозу в ділянці, яка відповідає легким (L) ланцюгам імуноглобулінів IgG (рис. 3.28, Г). Такого ефекту не спостерігалось за відсутності НПП чи за їх дії при 4°C.

Таким чином, зазначені зміни в глікозилюванні імуноглобулінів мають прямий зв'язок з утвореними НПП і їх появу можна відтворити *ex vivo*. Більш того, зміна глікозилювання залежить від температури, що вказує на те, що її індукує ензим, який асоційований із НПП (як ензими нейтрофільних гранул).

Отже встановлено, що при ВЛВХД спостерігаються ознаки, притаманні системним запальним процесам, – утворення в кровотоці імуноглобулінів IgG із зміненим глікозилюванням, такий спектр глікозилювання можна відтворити штучно *ex vivo*, інкубуючи зразки сироватки з НПП, що описано в публікації [115] та використано для доведення участі НПП в системних запальних процесах при розсіяному склерозі.

3.1.5.3. Активність еластази нейтрофілів у крові тварин на ВЛВХД та ВФД. Для з'ясування масштабів впливу НПП, а саме: чи утворення НПП має локальний характер в гепатобіліарній системі, чи впливає на весь організм за умов ВЛВХД та ВФД, ми визначили активність еластази нейтрофілів – ензиму нейтрофільних гранул, що екстерналізується за умов утворення НПП. Визначення здійснювали в крові (сироватці) тварин на 4 та 6 тижні (28 та 42 дні) перебування на ВЛВХД та ВФД. Для даного ензиму є доступним специфічний флуорогенний субстрат, що робить можливим виявлення його малих кількостей із високою специфічністю. Аналіз проводили, використовуючи флуориметричний аналізатор. Нами зафіксовано достовірне зростання активності еластази нейтрофілів за умов ВФД ($p=0,0148$, ANOVA) та за умов ВЛВХД ($p=0,0219$) на 6 тижень експерименту

(рис. 3.29). Водночас, на 4 тижень експерименту такі зміни ще не виявлялись, різниця між 4 і 6 тижнями експерименту була достовірно значущою ($p < 0,001$).

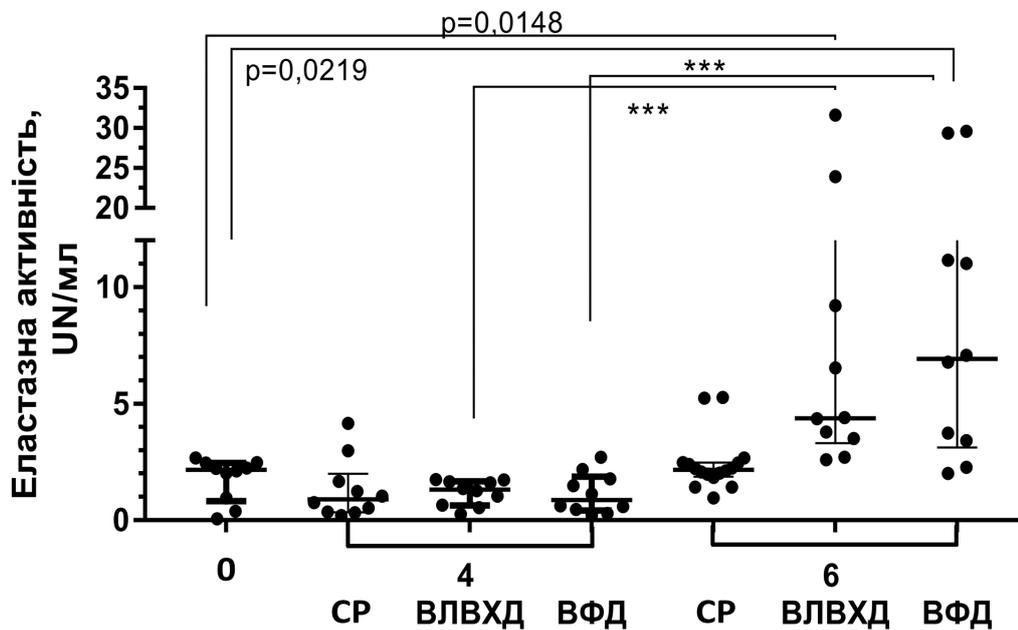


Рис. 3.29. Еластазна активність у сироватці мишей лінії C57BL6/N за умови НР, ВФД та ВЛВХД, визначена за розщеплення флуорогенного субстрату специфічного до еластази нейтрофілів. Цифрами вказано тривалість дієти в тижнях

Отже, високофруктозна дієта, як і високоліпідна високохолестеринова дієта, супроводжується зростанням рівня (природного) утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у жовчних протоках та міхурі, із утворенням агрегованих НПП. Активність еластази нейтрофілів виявлялась у крові мишей лінії C57BL6/N після 6 тижнів зазначеного раціону, що опубліковано в роботі [152].

Отримані результати вказують, що вплив ВФД та ВЛВХД на організм значно ширший, ніж це було описано раніше. За відомими нам даними, це перше достовірне свідчення того, що високий вміст фруктози в раціоні індукує утворення НПП у жовчних шляхах тварин.

3.1.5.4. Порушення екскреторних функцій гепатобіліарної системи за умов ВЛВХД. Оскільки утворені в гепатобіліарній системі НПП відомі своєю здатністю спричиняти оклюзію як жовчних проток [11], так і судин [46], ми вирішили дослідити функцію транспорту речовин із крові в жовч за умов ВЛВХД.

Для цього ми розробили функціональний тест, що базується на моніторингу флуоресценції барвника індоціаніну зеленого *in vivo*. Барвник індоціанін зелений є затвердженим FDA для виявлення судинних патологій. Він вводиться внутрішньовенно, з крові він швидко переходить в печінку, де акумулюється в жовчі і виводиться з організму [153, 154]. За порушення кровопостачання печінки його акумуляція буде сповільнена/відсутня.

Ми проаналізували флуоресценцію барвника ICG в тканинах організму лабораторних мишей, використовуючи аналізатор флуоресценції *in vivo*. Для тестування ефективності тест 10 мкг ICG вводили у хвостову вену миші і через 2 години здійснювали аналіз флуоресценції в тканинах за довжини хвилі 820 нм (флуоресценція індоціаніну) (рис. 3.30). За рекомендаціями виробника системи візуалізації флуоресценції, за кілька днів до експерименту в раціон тварин додатково вводили компоненти багаті хлорофілом [155]. Це дозволило візуалізувати кишківник за флуоресценцією похідних хлорофілу при 720 нм і нормалізувати сигнал.

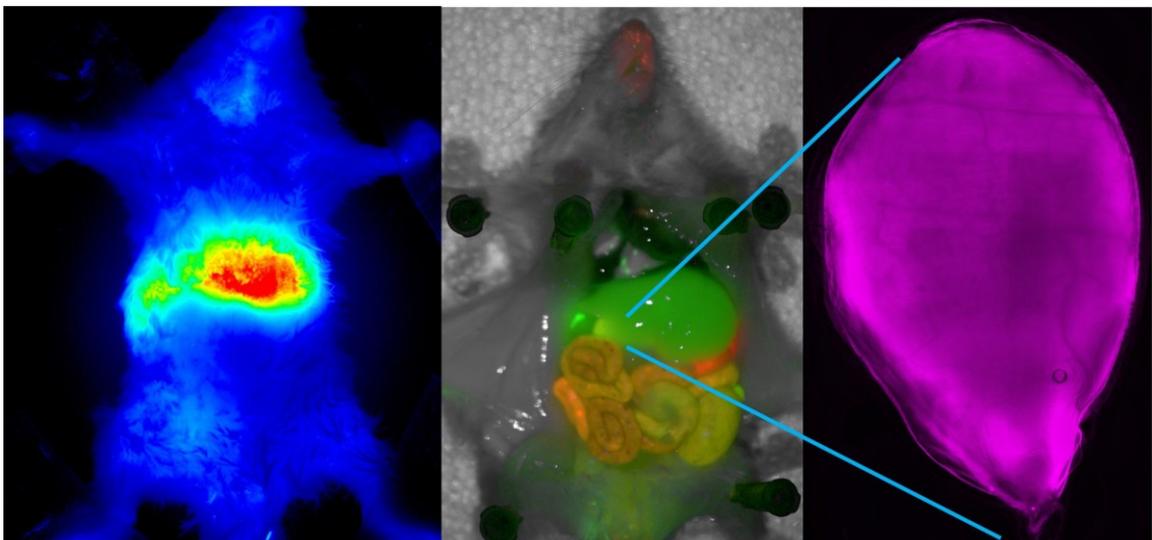


Рис. 3.30. Приклад використання системи візуалізації флуоресценції в тканинах для детекції компонентів гепатобіліарної системи. Ліворуч – тварина через 2 год після внутрішньовенного введення 10 мкг ICG, візуалізація інтенсивності флуоресценції при 820 нм. У центрі – ця ж тварина після розтину очеревини, флуоресценція ICG (820 нм) показана зеленим кольором, а хлорофілів (720 нм) – червоним кольором. Праворуч – аналіз флуоресценції жовчного міхура при 820 нм, об'єктив 10x 0,75NA.

Через 2 год тварину виводили з експерименту і здійснювали розтин очеревини, порівнюючи значення флуоресценції до та після розтину (рис. 3.30), додатково жовчний міхур аналізували на флуоресценцію ICG за допомогою модулю Keyence VZ-X800E, що дозволяло добитись роздільної здатності, достатньої для спостереження окремих судин на жовчному міхурі миші (рис. 3.30).

Продемонструвавши ефективність запропонованого методу детекції, ми використали його для аналізу накопичення ICG в тканинах печінки у тварин, що перебували на ВЛВХД дієті (32 – 35 днів) та стандартному раціоні. Типові значення динаміки розподілу ICG в тілі тварин представлено на рис. 3.31. За умов ВЛВХД спостерігали значно менший рівень флуоресценції ICG в ділянці печінки, що свідчить про ушкодження кровопостачання печінки тварин на ВЛВХД.

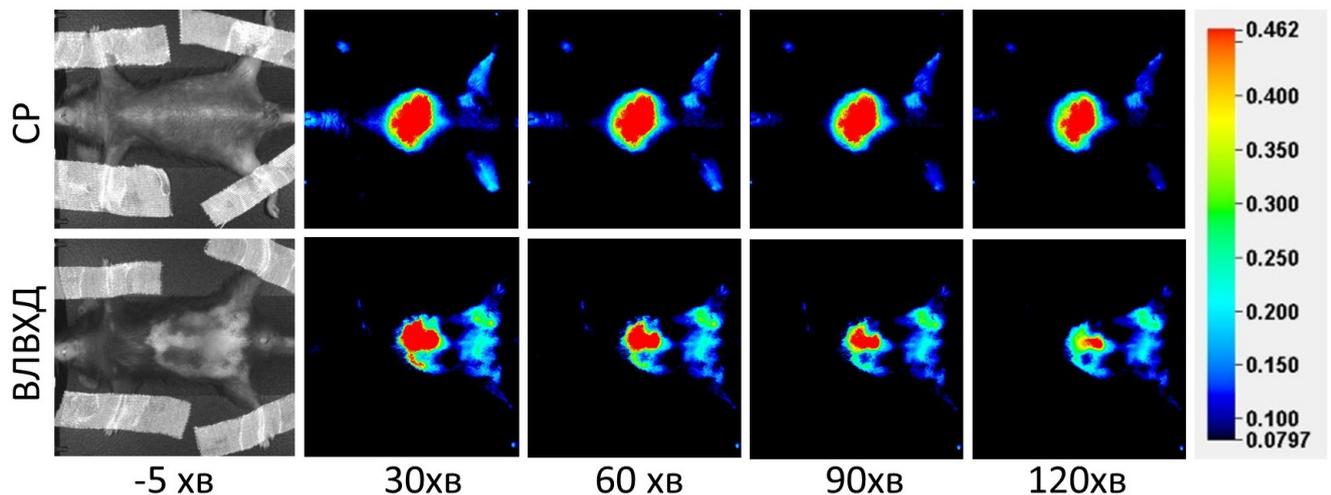


Рис. 3.31. Динаміка розподілу ICG в тілі тварин за стандартного раціону та за ВЛВХД. У хвостову вену вводили 10 мкг ICG, після чого аналізували флуоресценцію тварин при 820 нм. Ліворуч – світлове зображення тварини, введеної в наркоз до моменту введення ICG. Праворуч – шкала інтенсивності флуоресценції.

Через 2 год тварин виводили з експерименту. Їх розтин продемонстрував не лише локалізацію основної маси флуоресцентного сигналу в печінці, а згодом і в жовчному міхурі, а також зміну кольору печінки внаслідок накопичення ліпідів при ВЛВХД та збільшення маси печінки (рис. 3.32).

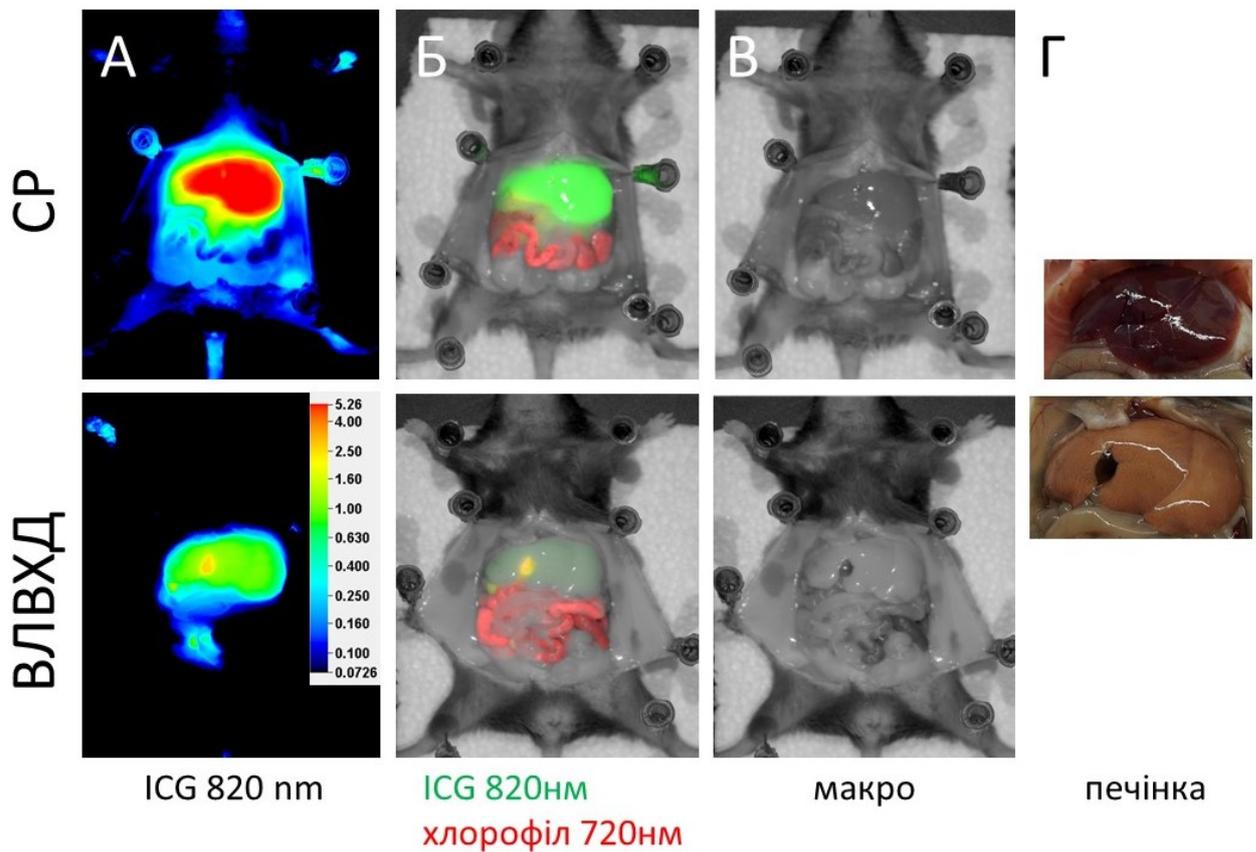


Рис. 3.32. Накопичення ICG в тканинах печінки та жовчного міхура через 2 години після внутрішньовенного введення тваринам на стандартному раціоні та ВЛВХД. А – розподіл флуоресценції при 820 нм в тілі тварин. Б – флуоресценція ICG (показана зеленим) та хлорофілів (червоний) після розтину тіла тварин. В – світлова фотографія тварин, що показує дисколорацію печінки, Г – макрофотографія печінок тварин. Масштаб збережено

Спосіб неінвазивної оцінки ушкодження мікроциркуляторного русла печінки описано в роботах [156, 157].

3.1.5.5. Активація еластази нейтрофілів у гепатобіліарній системі *in vivo* за умов ВЛВХД та ВФД. Для прямої прижиттєвої візуалізації активності еластази нейтрофілів у тілі тварин за умов ВЛВХД та ВФД ми використали флуоресцентний зонд Perkin Elmer Neutrophil Elastase 680 FAST NIR fluorescent probe. Це два флуорофори із флуоресценцією в інфрачервоній ділянці спектру, які з'єднані коротким з'єднуючим пептидом. Флуорофори контактують один з одним і взаємно

пригнічують флуоресценцію, а з'єднуючий пептид містить ділянку розщеплення ензимом еластазою нейтрофілів. Коли цей ензим активується, він розщеплює пептид і стерична взаємодія між молекулами флуорофорів припиняється, і вони набувають здатності до флуоресценції за умов збудження відповідним лазером. Використання інфрачервоного лазера 685 нм в аналізаторі флуоресценції LiCor Pearl Trilogy дозволяє виміряти флуоресценцію похідних сполуки після її внутрішньовенного введення.

Мишам, які перебували 6 тижнів на ВЛВХД або ВФД внутрішньовенно вводили 4 нМ сполуки та визначали динаміку її активації (рис. 3.33). Найбільший пік активності в нашій системі ми спостерігали на 4 годину після введення, що відповідає діапазону заявленому виробником (3 – 12 год).

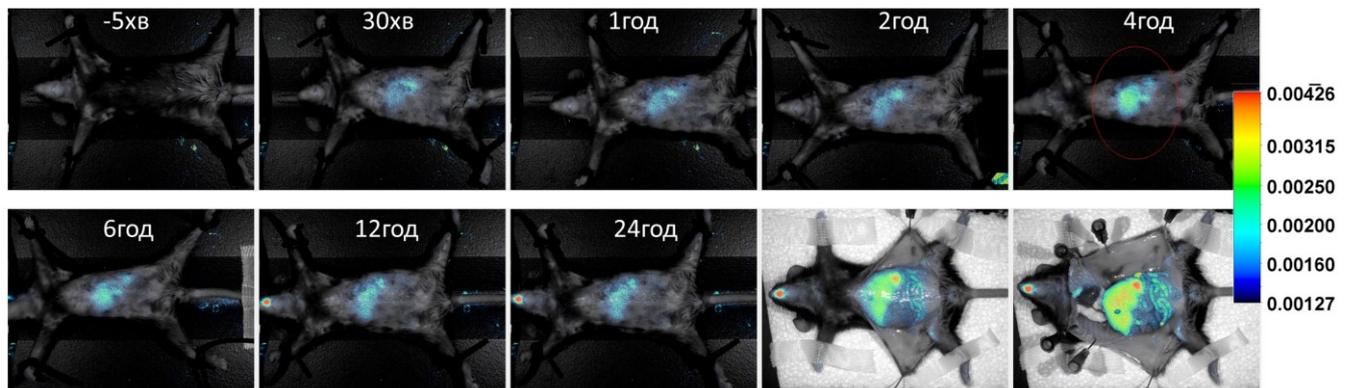


Рис. 3.33. Динаміка активації мітки Perkin Elmer Neutrophil Elastase 680 FAST NIR fluorescent probe після введення 4 нМ миші внутрішньовенно. Максимальний сигнал спостерігається на 4 годину. Кольорова шкала відображає інтенсивність флуоресценції.

Опісля тваринам вводили 4 нМ сполуки внутрішньовенно та визначали рівень флуоресценції в їх тілі, виводили тварин з експерименту та аналізували флуоресценцію в окремих органах. Як при ВЛВХД, так і при ВФД ми спостерігали зростання рівня флуоресцентного зонду еластази нейтрофілів у печінці та у селезінці, порівнюючи із тваринами на стандартній дієті. Клітини селезінки було виділено та проаналізовано мікроскопічно використовуючи додаткове фарбування на маркери нейтрофілів (CD11b) та екстерналізовану ДНК (Sytox green)

(рис. 3.34, В). В селезінці виявляли численні НПП асоційовані з сполукою-міткою активації NE та гранулами CD11b, що залишилися після руйнування нейтрофілів при формуванні НПП. Активація еластази нейтрофілів в печінці підтверджує наші результати про системну запальну реакцію, спричинену ВЛВХД та ВФД.

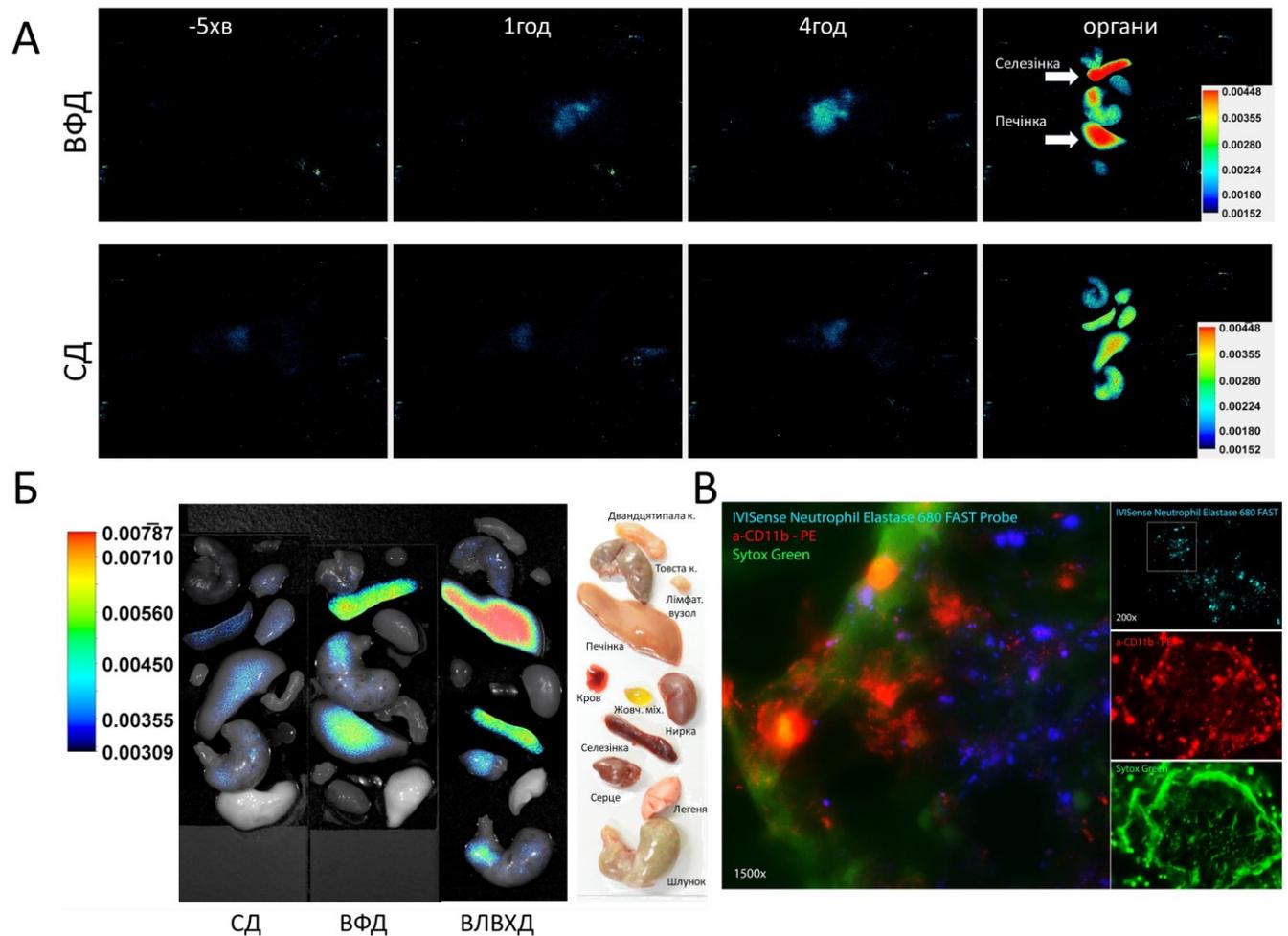


Рис. 3.34. Активації мітки Perkin Elmer Neutrophil Elastase 680 FAST NIR fluorescent probe в органах мишей на різних типах раціону. Аналіз на 4 год після введення внутрішньовенно 4 нМ зонду. А – порівняння сигналу в тварині на ВФД та СД на 1 та 4 години і в органах. Б – порівняння сигналу зонду-маркера активної еластази нейтрофілів в основних органах за СД, ВФД, ВЛВФД. В – мікроскопічний аналіз ділянок сигналу зонду в ізольованих клітинах селезінки вказує на наявність екстерналізованої ДНК (Sytox green) та залишків нейтрофільних маркерів – CD11b, Об'єктив 40x 0,95NA.

Отже, використання запропонованого зонду дозволяє здійснити пряму прижиттєву візуалізацію активації еластази нейтрофілів у тварин з ВЛВХД і ВФД і виявити її активацію не лише в печінці, а й в селезінці, дані спостереження опубліковано в роботі [157].

3.1.5.6. Роль оклюзії проток жовчного міхура в ушкодженні тканин печінки при високохолестериновій дієті. Проведені нами дослідження жовчних міхурів вказують на утворення в них каменів. НПП ініціюють утворення жовчних каменів та оклюзію жовчних проток [11]. Тож наступним завданням ми перевірили чи утворення каменів у жовчному міхурі та оклюзія міхурових жовчних проток не призведе до надмірного утворення жовчі, яка б ушкоджувала клітини печінки. Альтернативною гіпотезою було припущення, що НПП забезпечують мікрооклюзію жовчних проток між гепатоцитами і аж до рівня печінкових проток, а це призводить до неможливості відтоку жовчі, що володіє функціями детергенту і ушкоджує гепатоцити [121, 122].

Для перевірки даної гіпотези ми обрали іншу модель – модель високохолестеринової (ВХД) дієти у щурів лінії Wistar, адже у щурів відсутній як жовчний міхур, так і міхурова протока, а утворена жовч через малі збірні протоки потрапляє із печінки в кишківник. Порівняльна анатомія гепатобіліарної системи миші та щура наведена на рис. 3.35 (дані авторів Higashiyama та колег, 2018 р. [158]). Зразки тканин (печінки) та плазми тварин цієї тваринної моделі [159] були люб'язно надані нам завідувачем відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, доктором біологічних наук Володимиром Чернишенком. Для цього, у розробленій автором моделі, щурів годували виключно їжею багатою на холестерин.

Нами було проведено гістологічний аналіз тканин печінки тварин на СД та ВХД щодо морфологічних змін, а також проаналізовано вміст плазми крові щодо активності еластази нейтрофілів. В тканинах печінки за ВХД у щурів ми спостерігали такі ж зміни, як і у мишей на ВЛВХД, зокрема, збільшення площі гепатоцитів за рахунок накопичення ліпідних включень, деструкцію ядер, ушкодження жовчних проток та лейкоцитарну інфільтрацію (рис. 3.36, А). Водночас активність еластази нейтрофілів в крові тварин на ВХД була майже

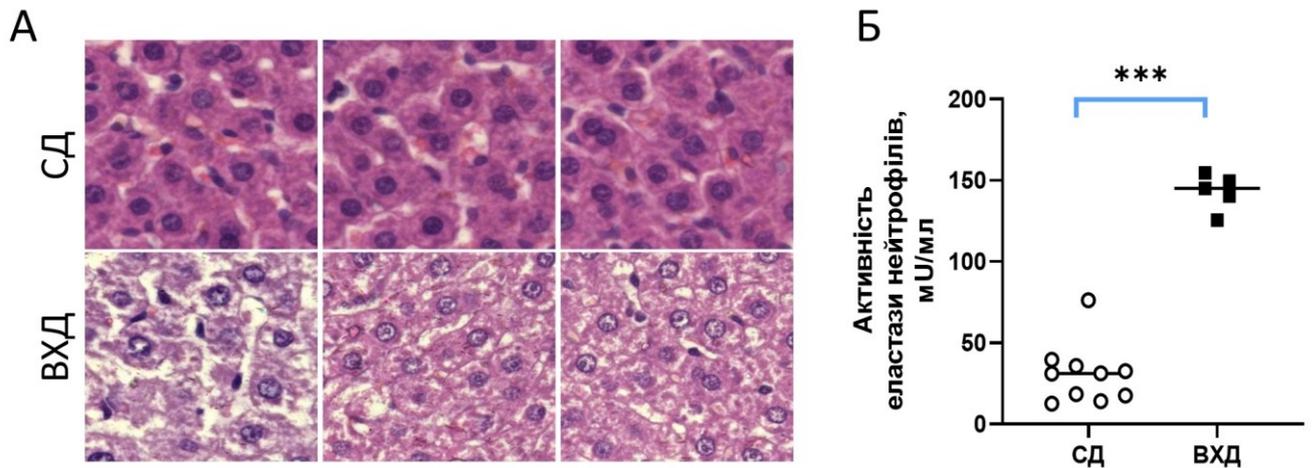


Рис. 3.36. Вплив високохолестеринової дієти на морфологію печінки (А) та активність еластази нейтрофілів в плазмі крові (Б) у лабораторних щурів. А – фарбування Н&Е, об'єктив 40x 0,95NA.

Отримані нами дані вказують, що ушкодження печінки та активація нейтрофільних гранулоцитів за перебування тварин на раціоні з підвищеним вмістом холестерину не пов'язані з утворенням каменів у жовчному міхурі чи оклюзією міхурової протоки каменем. Очевидно, що патологічні зміни виникають від мікрооклюзій, індукованих НПП у самій тканині печінки.

3.1.6. Стратегії запобігання ушкодженню тканин гепатобіліарної системи при ВЛВХД

3.1.6.1. Усунення нейтрофільних гранулоцитів за допомогою моноклональних антитіл та вплив на гепатобіліарну систему при ВЛВХД.

Оскільки нами було виявлено нейтрофільні гранулоцити на мікрокристалах холестерину, утворених у жовчному міхурі, ми вирішили зосередити увагу на цьому факті. Адже відомо, що нейтрофільні гранулоцити «патрулюють» протоки, переміщуючись по поверхні проток із метою захисту від патогенів. Проте, при деяких патологічних станах, нейтрофіли за рахунок утворених внутрішньопротокових агрегатів НПП, закупорюють протоки підшлункової залози [50]. Раніше в роботі [4] було описано, що взаємодія малих гідрофобних НЧ з

плазматичною мембраною клітин призводить до її пошкодження та активації нейтрофілів з утворенням НПП. В роботі [13] показано, що гідрофобні кристали холестерину також можуть індукувати утворення НПП. Водночас, кристали холестерину утворюються в організмі у жовчному міхурі та протоках природним чином.

Для перевірки гіпотези щодо вирішального впливу нейтрофільних гранулоцитів у розвитку патологій гепатобіліарної системи ми перевели тварин лінії C57BL6N на ВЛВХД (в цій системі ушкодження печінки виявляються швидше, а, зважаючи на вартість та доступність антитіл, ми повинні були скоротити тривалість тестування) та одній групі здійснювали підшкірне введення анти-Ly6G антитіл клону 1A8. Антитіла цього клону, зв'язуючись з нейтрофільними гранулоцитами, індукують їх лізис, в результаті тварина залишається майже повністю без нейтрофільних гранулоцитів на період до двох днів після ін'єкції [160, 161]. Тому ін'єкції здійснювали через день по 500 мкг антитіл на тварину. Для контролю використали ізотипний контроль антитіл відповідного класу IgG – 2A3, які вводили в аналогічних дозах та часових проміжках. Через 35 днів тварин виводили з експерименту, здійснювали аналіз вмісту їх жовчних проток на наявність НПП, фіксацію тканин печінки з наступним гістологічним аналізом та морфометричним аналізом площі клітин та вмісту ліпідів. Визначали вагу тварин, а також здійснювали гістологічний аналіз тканин печінки та визначення активності маркерних ензимів нейтрофілів у крові. Схему експерименту зображено на рис. 3.37.

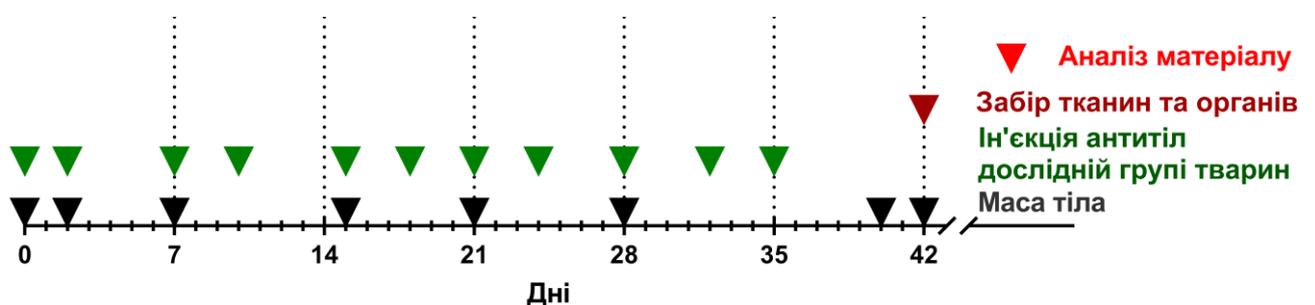


Рис. 3.37. Схема експерименту щодо визначення ролі нейтрофілів у розвитку патологічних змін тканин при ВЛВХД

Для оцінювання маси тіла проводили зважування тварин у середньому щодня 5–6 днів. Результати зміни маси тіла представлені на рис. 3.38. У групі СД зафіксовано незначне зростання маси тіла (в середньому) від 22,5 г до 23,0 г протягом 42 днів експерименту. Водночас, в групі ВЛВХД спостерігалось зростання маси тіла з 23,5 г до 25,4 г. Також при ВЛВХД при руйнуванні нейтрофілів відбувалось зростання маси тіла від 23,4 г до 25,1 г. Як і в попередніх дослідках, на початку експерименту, при зміні стандартного корму на високоліпідний, тварини відмовлялись від корму та втрачали вагу. Це може бути спричинено і як психологічною адаптацією до нового типу корму, так і опірністю організму високожировому кормі. Проте після адаптації до споживання високоліпідного корму у дослідній групі тварин спостерігався постійний посилений апетит. Дані зміни маси тіла між групами із СД та ВЛВХД статистично різнилися починаючи з 21 дня експерименту ($p < 0.05$). Достовірної різниці у зміні маси тіла між тваринами на ВЛВХД, яким вводили антинейтрофільні антитіла 1А8, та тваринами на ВЛВХД з плацебо не спостерігали.

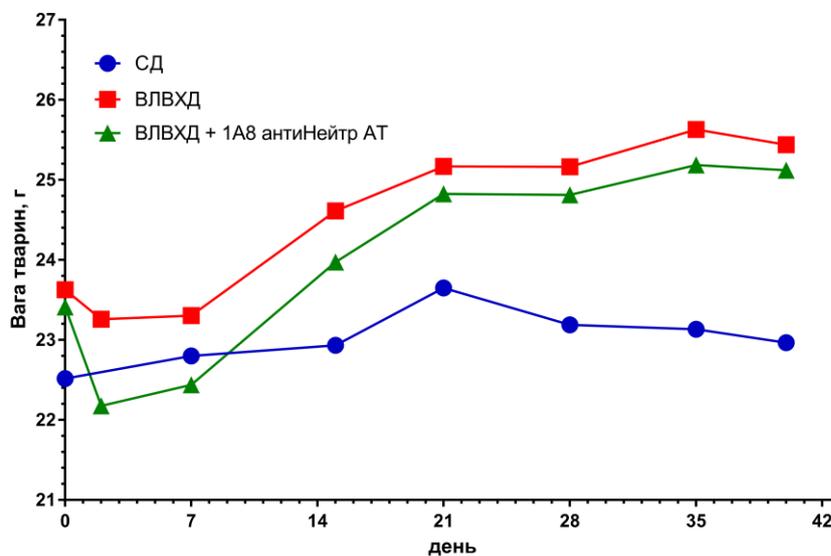


Рис. 3.38. Зміни маси тіла за стандартної дієти (СД), високоліпідної високохолестеринової дієти (ВЛВХД) із одночасним введенням антинейтрофільних антитіл 1А8 та високоліпідної високохолестеринової дієти (ВЛВХД) за введення ізотипних антитіл у досліджуваних мишей протягом 42 днів. Різниця між групами СД та обома групами з ВЛВХД є статистично достовірною, починаючи з 21 дня експерименту.

Для оцінки ушкоджень печінки при усуненні нейтрофілів у тварин ми проаналізували органи, забрані в груп СД, ВЛВХД та ВЛВХД + антинейтрофільні антитіла (АТ), отримані на 42 день експерименту. Препарати було зафарбовано гематоксилін-еозином, здійснено їх мікрофотографування та визначено «індекс ушкодження печінки», як описано вище, на основі параметрів ушкодження клітин, вакуолізації клітин, інфільтрації лейкоцитів та руйнування судин. Результати оцінки тканин печінки у трьох групах тварин наведені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Оцінка параметрів ушкодження тканин печінки
за індукованого руйнування нейтрофілів

№	Тип дієти	Тривалість, тижнів	Ушкодження клітин	Клітинна вакуолізація	Інфільтрація лейкоцитів	Руйнування судин та/чи проток	Сума індексів ушкодження печінки	Добуток індексів ушкодження печінки
1	СД	0	1	1	1	1	4	1
2	СД	0	1	1	2	1	5	2
3	СД	0	1	1	2	1	5	2
4	СД	0	1	1	1	1	4	1
5	СД	0	1	2	1	1	5	2
6	ВЛВХД+1А8антиНейтрАТ	6	2	3	2	3	10	36
7	ВЛВХД+1А8антиНейтрАТ	6	2	2	2	3	9	24
8	ВЛВХД+1А8антиНейтрАТ	6	2	3	2	3	10	36
9	ВЛВХД+1А8антиНейтрАТ	6	3	2	2	3	10	36
10	ВЛВХД+1А8антиНейтрАТ	6	1	3	2	2	8	12
11	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	4	2	3	12	72
12	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	2	4	3	3	12	72
13	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	2	3	3	3	11	54
14	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	3	2	4	12	72
15	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	3	3	4	13	108
16	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	4	3	4	14	144
17	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	3	2	3	11	54
18	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	4	2	3	12	72
19	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	4	2	3	12	72
20	ВЛВХД+2А3 неспец. АТ	6	3	4	3	1	11	36

Значення індексу ушкодження тканин печінки СД – $1,62 \pm 0,24$, при ВЛВХД – $75,6 \pm 9,6$, а при ВЛВХД за умов руйнування нейтрофілів – $28,8 \pm 4,8$.

Руйнування нейтрофілів призводило до достовірно ($p < 0,05$) нижчого значення індексу ушкодження тканин (рис. 3.39).

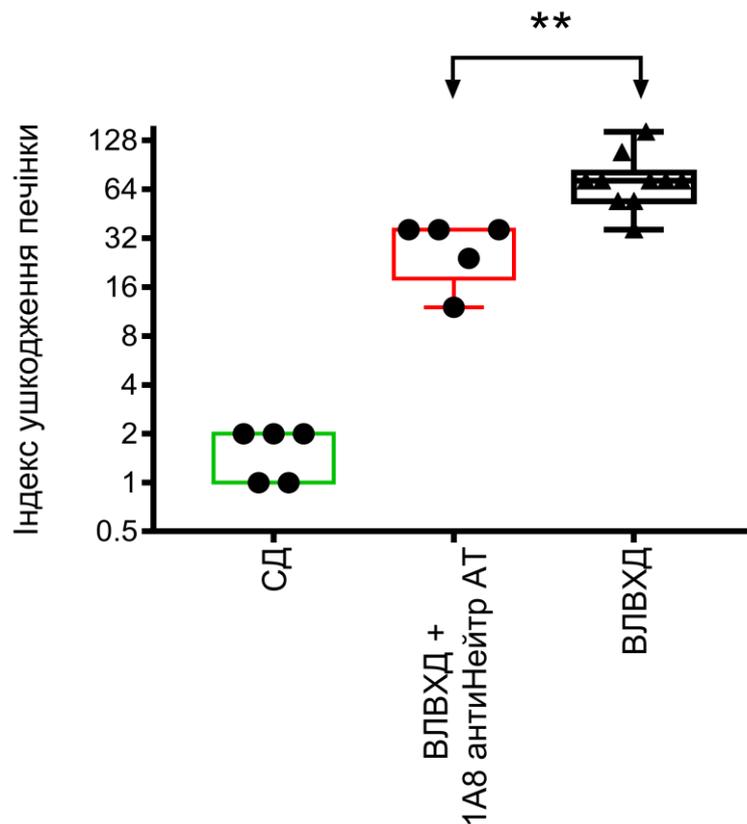


Рис. 3.39. Індекс ушкодження тканин печінки на різних етапах високоліпідної високохолестеринової дієти за індукованого руйнування нейтрофілів

Морфометричний аналіз тканин печінки вказує на виражені ознаки НАСГ за умов дії ВЛВХД та контрольних ізотипних антитіл (рис. 3.40). При цьому відбувається достовірне зростання як площі гепатоцитів, так і вмісту в них ліпідів. Водночас за ВЛВХД та постійної дії анти-Ly6G антитіл, що лізували нейтрофіли, міра ушкоджень тканини печінки була значно меншою. А площа гепатоцитів, як і вміст ліпідів, були достовірно меншими, ніж ті, що спостерігались у тварин з функціональними нейтрофілами.

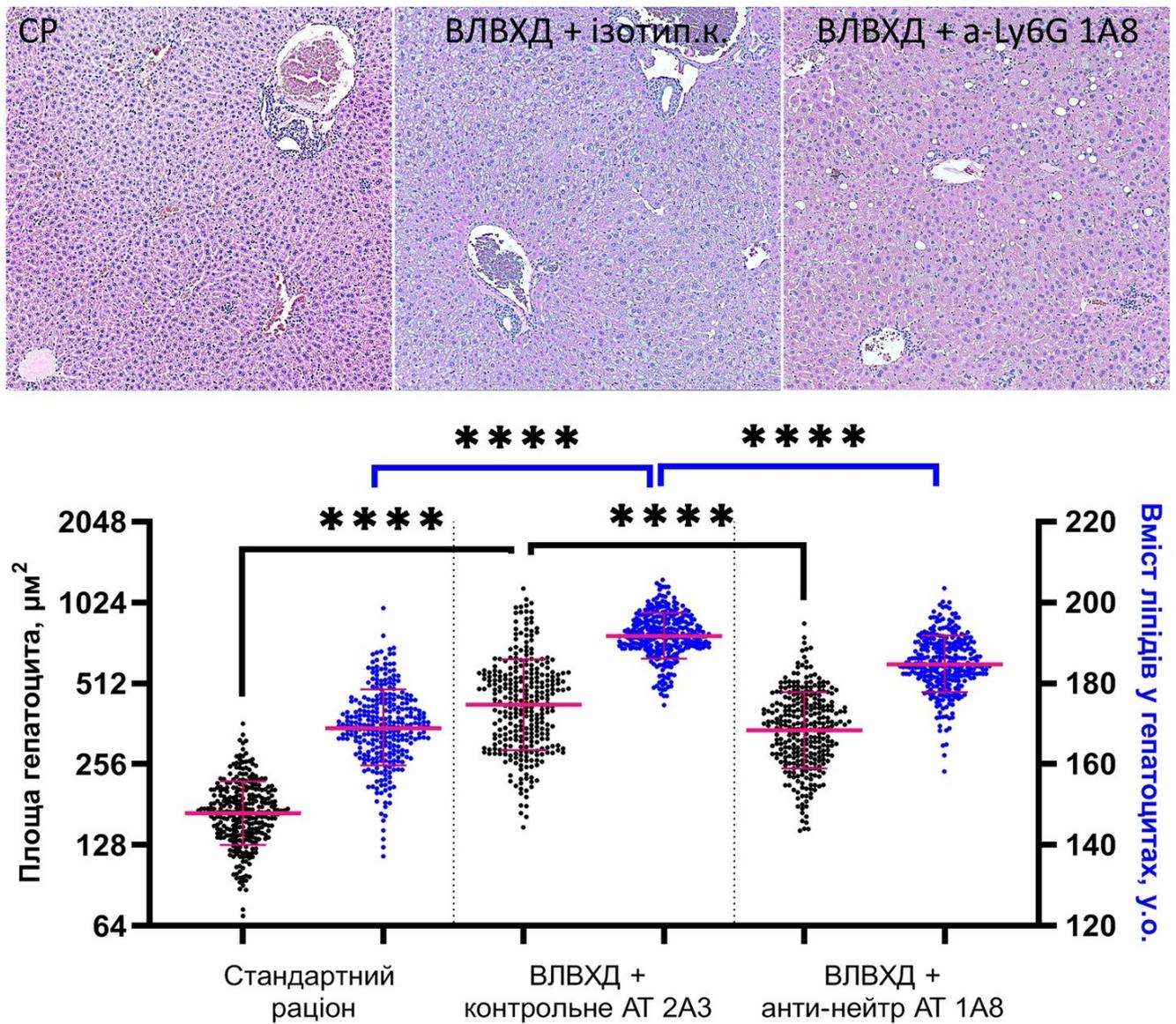


Рис 3.40. Вплив анти-нейтрофільних антитіл Ly6G клон 1A8, які індукують лізис нейтрофілів, на тканини печінки за дії ВЛВХД. Зверху – морфологія тканин печінки, фарбування Н&Е, об'єктив 10x 0,45NA, знизу – площа та вміст ліпідів у гепатоцитах

Аналіз вмісту НПП у зразках жовчі, отриманих із досліджуваних тварин, вказує на зменшення рівня НПП за умов руйнування нейтрофільних гранулоцитів антитілами, водночас за дії ВЛВХД вміст НПП у жовчних міхурах був значним (рис. 3.41, А).

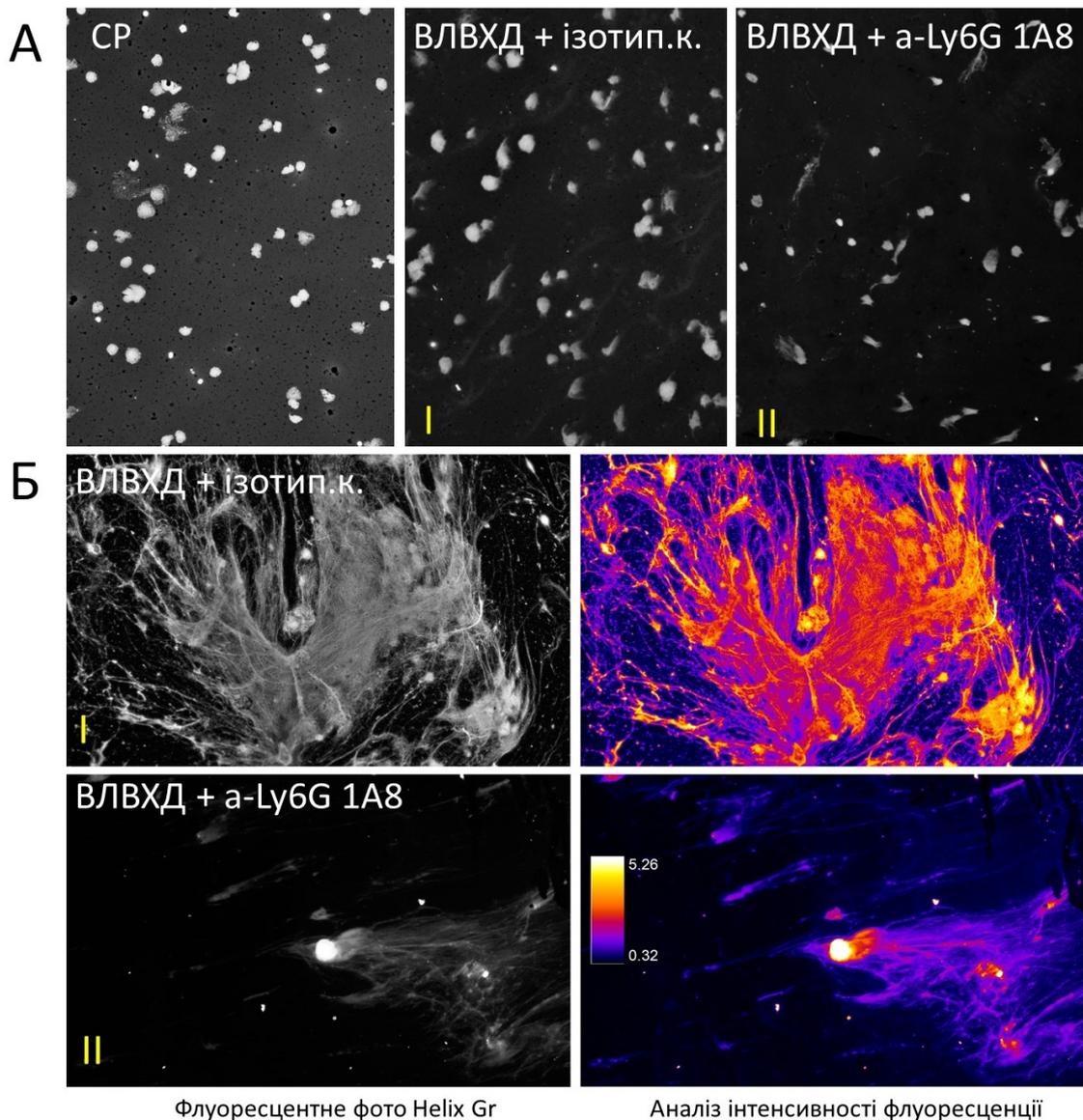


Рис. 3.41. Аналіз вмісту НПП у матеріалі жовчного міхура та проток тварин, що перебували на стандартному раціоні чи ВЛВХД за дії анти-нейтрофільних антитіл чи їх ізотипного контролю. А – детекція за допомогою флуоресцентного мікроскопу з використанням чутливої камери. Б – детекція за допомогою системи аналізу флуоресценції Keyence VZ-X800E та використання її програмного забезпечення для аналізу інтенсивності флуоресценції. Шкала показує градації інтенсивності, наведені числа – це степінь логарифму (10^x), використаний для аналізу, фарбування PI, об'єктив 40x 0,95NA

Використання систем детекції з широким динамічним діапазоном, наприклад Keyence VZ-X800E із динамічним діапазоном 14bit та системою посилення сигналу до +24dB, дозволило проаналізувати вміст НПП у зразках, які не піддаються

детекції іншими методами. Труднощі такого аналізу полягли у тому, що при утворенні НПП нейтрофільні гранулоцити деконденсують ДНК і вона як «хмара» розпорошується на великі площі [136], відповідно інтенсивність флуоресцентного сигналу специфічних барвників до деконденсованої ДНК (наприклад барвника Helix Green, використаного нами) не завжди достатня для детекції доступними засобами реєстрації. Отримані мікрофотографії НПП в жовчному міхурі прямим чином доводять можливість перебування нейтрофільних гранулоцитів у середовищі жовчі, про що раніше не було прямих доказів. Дані мікрофотографії опубліковано на обкладинці журналу Праці Наукового товариства імені Шевченка, Медичні науки, Том 55, в.1, 2019 (додаток В).

Із даних [52, 53] відомо, що реєстрований сигнал зазвичай являє собою лише центральну частину НПП, водночас окремі нитки ДНК залишаються непоміченими внаслідок інструментальних обмежень. Додатковий аналіз інтенсивності сигналу за допомогою програмно-апаратних методів дозволяє добре візуалізувати розподіл вмісту екстерналізованої деконденсованої ДНК. Рис. 3.41, А та 3.41, Б дозволяють порівняти фотографії відповідних препаратів (I та II), проаналізованих за допомогою мікроскопу Olympus BZ-51 (рис. 3.41, А) та системи аналізу флуоресценції Keyence BZ-X800E (рис. 3.41, Б).

В обох випадках чітко продемонстровано, що дія антинейтрофільних антитіл зменшує вміст НПП.

Ензим нейтрофільна еластаза є маркерним ензимом нейтрофільних гранул, проте при утворенні НПП він викидається на поверхню пасток. Цей ензим детектується в крові при зростанні рівня утворення НПП [46]. Оскільки нейтрофільна еластаза має специфічний сайт розщеплення, він був нами використаний для створення специфічного пептидного субстрату із флуорогеном. При дії еластази вивільняється флуороген, який виявляли флуоресцентним мікропланшетним аналізатором, як описано в розділі 2.

Для аналізу використовували сироватку крові мишей на 42 день експерименту. Оцінка активності нейтрофільної еластази показала її значне зростання при ВЛВХД (до 11.47 ± 1.71 мОд/мл), порівнюючи з групою на СД

(4.57 ± 0.67 МОд/мл), та групою, що перебувала на ВЛВХД із одночасним руйнуванням нейтрофілів (6.50 ± 0.45 МОд/мл). Останні зміни були достовірно значущими, $p < 0.05$ (рис. 3.42).

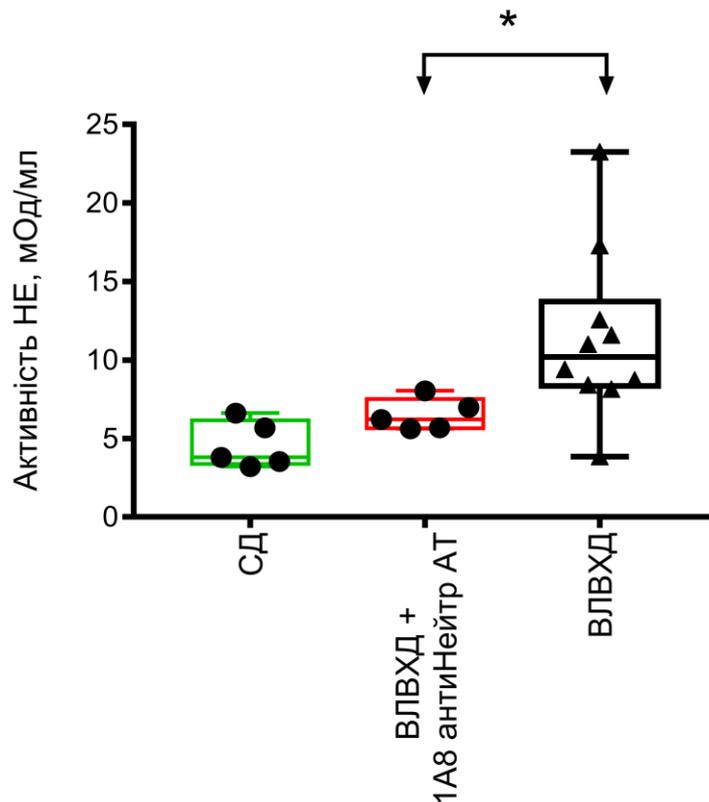


Рис. 3.42. Активність нейтрофільної еластази в сироватці крові дослідних тварин на 42 день експерименту. Детекція розщепленого флуорогенного субстрату

Після завершення експерименту ми досліджували вміст жовчних міхурів на предмет гіпертрофії, виявлення патологічних змін, наявності жовчних каменів чи інших змін. Спостерігали гіпертрофію жовчних міхурів в усіх (5 із 5) тварин у кожній групі. Проте в групі тварин за ВЛВХД у жовчних міхурах спостерігалось накопичення желеподібної речовини, яка при подальшому аналізі була ідентифікована як кристали холестерину. Однак у групі на ВЛВХД хоча і спостерігали гіпертрофію жовчних міхурів, кристалів холестерину виявляли набагато менше. Органи мікрофотографували за допомогою фотосистеми Nikon MicroNikkor (рис. 3.43).



Рис. 3.43. Утворення каменів у жовчному міхурі після перебування тварин упродовж 42 днів в умовах ВЛВХД та ВЛВХД з одночасним руйнуванням нейтрофільних гранулоцитів. Макрофотографія, об'єктив Micro Nikkor 1:2.8G

Для оцінки розміру та кількості холестеринових каменів в обох групах, вміст міхурів був кількісно оброблений та мікрофотографований за допомогою поляризаційного мікроскопу (рис. 3.44), до уваги брались лише ті кристали, що володіли здатністю поляризувати світло (виявлялись у поляризаційному мікроскопі).

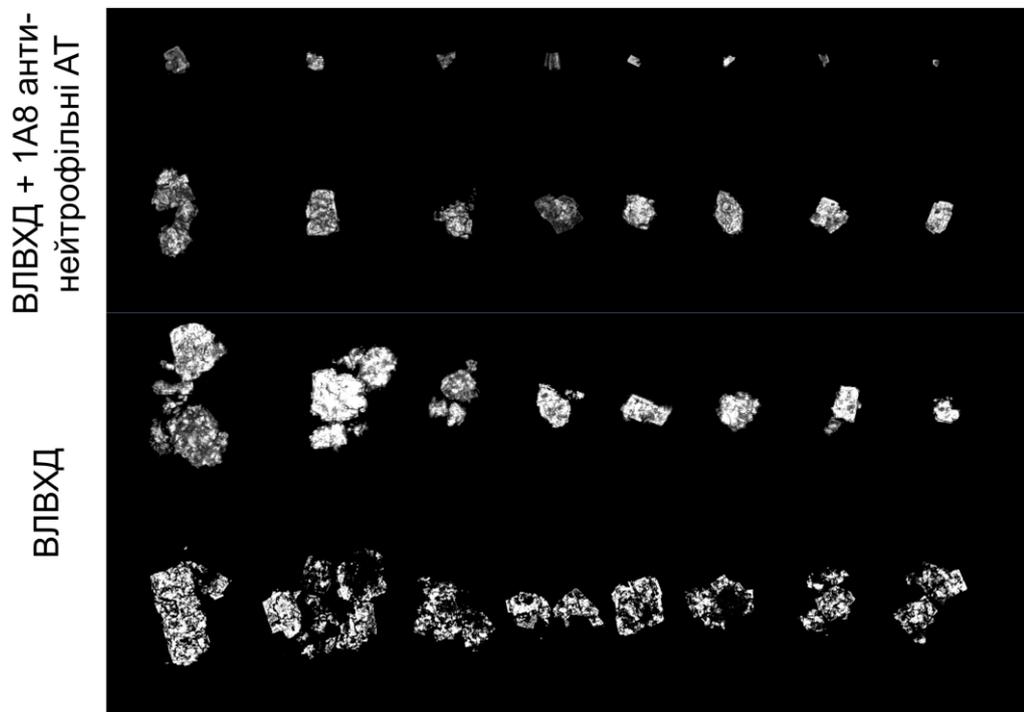


Рис. 3.44. Поляризаційна мікроскопія гелеподібного вмісту жовчних міхурів після перебування тварин упродовж 42 днів в умовах ВЛВХД та ВЛВХД з одночасним руйнуванням нейтрофільних гранулоцитів. Аналіз поляризуючого матеріалу, отриманого із 5 тварин в кожній групі. Мікрофотографії відсортовані за зменшенням розміру. Макрофотографія, об'єктив Micro Nikkor 1:2.8G

Отримані результати дозволяють зробити наступні висновки:

- ВЛВХД супроводжується зростанням рівня еластази нейтрофілів в крові після 35 днів перебування тварин на дієті;
- усунення нейтрофілів з крові запобігає розвитку ознак НАСГ в печінці та запобігає зростанню кількості НПП в жовчному міхурі та протоках;
- при НАСГ спостерігається порушення мікроциркуляторного русла печінки, зокрема, порушення перенесення сполук із крові в тканини печінки, внаслідок мікрооклюзії капілярів.

Дані результати доводять участь НПП в ушкодженні тканин печінки при НАСГ.

3.1.6.2. Запобігання ушкодженню тканин печінки шляхом керованого впливу на утворення НПП за допомогою фармакологічно доступних сполук. У контрольованому експерименті нам вдалось зменшити ознаки НАСГ за ВЛВХД шляхом усунення нейтрофільних гранулоцитів, даний експеримент має лише теоретичне значення.

Однак практичне використання даних експерименту для терапевтичних цілей є малоімовірним, оскільки: 1) без нейтрофілів організм стає вразливим до інфекцій і тварини потребували перебування в стерильних чи близьких до стерильних умовах; 2) вартість використаних антитіл робить його малодоступним.

Тому виникає потреба контрольованого впливу на агрегати НПП, використовуючи фармакологічно доступні сполуки з іншими точками впливу на шляху екстравазації нейтрофілів, їх активації, утворення НПП, агрегації НПП та їх наступного руйнування.

Запобігання агрегації НПП фраксипарином. Насамперед ми дослідили шляхи запобігання агрегації НПП. Довести блокування утворення НПП в організмі дуже важко, адже, як ми показали, вони схильні депонуватись у віддалених органах. Тому для дослідження шляхів запобігання агрегації НПП ми використали систему *ex vivo*, коли із крові здорових донорів виділяли популяції неактивованих нейтрофілів, які концентрували до тієї їх кількості, яка спостерігається в ділянках

запалення [25], і активували за допомогою НЧ моноурату натрію – відомого індуктора НПП [25, 162].

Для запобігання агрегації НПП ми протестували кілька заряджених полімерів, ДНКазу та інші сполуки. Найкращі результати спостерігали при дії заряджених глікозаміногліканів, зокрема комерційно доступного та фармакологічно апробованого низькомолекулярного гепарину анти-Ха – фраксипарину/надропарину. Дія цієї сполуки пов'язана із зв'язуванням заряджених молекул ДНК, що утворюються при активації НПП, і запобігання подальшому утворенню агрегатів НЧ, ДНК та клітин. Встановлено, що додавання фраксипарину в концентрації 1 МО/мл суспензії майже повністю запобігає утворенню НПП (рис. 3.45).

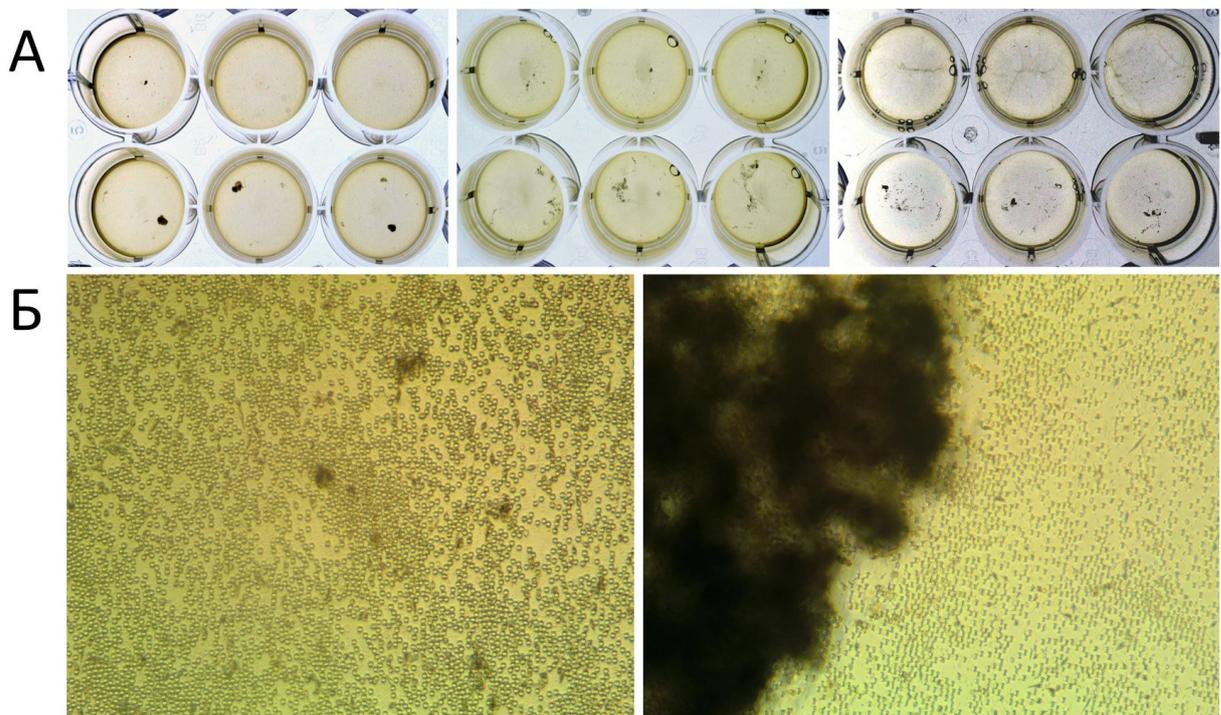


Рис. 3.45. Запобігання агрегації нейтрофільних гранулоцитів дією фраксипарину (1 МЕ/мл). А – аналіз агрегації НПП в культуральному посуді за дії кристалів моноурату натрію, верхній ряд – за додавання фраксипарину, нижній ряд – без фраксипарину; діаметр лунки – 1см, чорні крапки в нижньому ряду вказують наскільки великими (і небезпечними!) є агреговані НПП, наприклад, в кровотоці. Б – мікроскопічний аналіз, ліворуч – за дії фраксипарину, праворуч – за його відсутності; чорна маса праворуч є оптично-щільним агрегатом НПП, об'єktiv 10x 0,45NA

Отже, можна рекомендувати використання фраксипарину, який є фармакологічно доступною сполукою, яка пригнічує агрегацію НПП, а це відкриває перспективи для розробки терапевтичних засобів запобігання оклюзії судин і проток при гіперактивації нейтрофільних гранулоцитів за умов гострого/хронічного запалення.

Запобігання екстравазації нейтрофілів метропололом. Щоб запобігти ушкодженню тканин печінки та розвитку НАСГ внаслідок гіперактивації нейтрофільних гранулоцитів до утворення НПП, ми спробували використати фармакологічні сполуки, здатні впливати на активність нейтрофілів. Зокрема, ми зупинили свій вибір на метопрололі [163, 164] (МП) – бета-адреноблокаторі, що запобігає екстравазації нейтрофілів. У експерименті використали метопролол, який додавали як до води, так і до корму лабораторних тварин, а також гранулоцит-колонієстимулюючий фактор (gCSF), який вводили тваринам що 2 дні підшкірно з метою збільшення кількості нейтрофілів в крові та їх схильності до утворення НПП [165–167]. Як позитивний контроль розвитку фіброзу печінки використовували інгаляції чи підшкірні ін'єкції CCl_4 . Аналіз вмісту жовчних міхурів виявив численні камені в їх складі, які були мікрофотографовані за допомогою поляризаційної мікроскопії (рис. 3.46) з наступним підрахунком площі усіх каменів в групах (рис. 3.47).

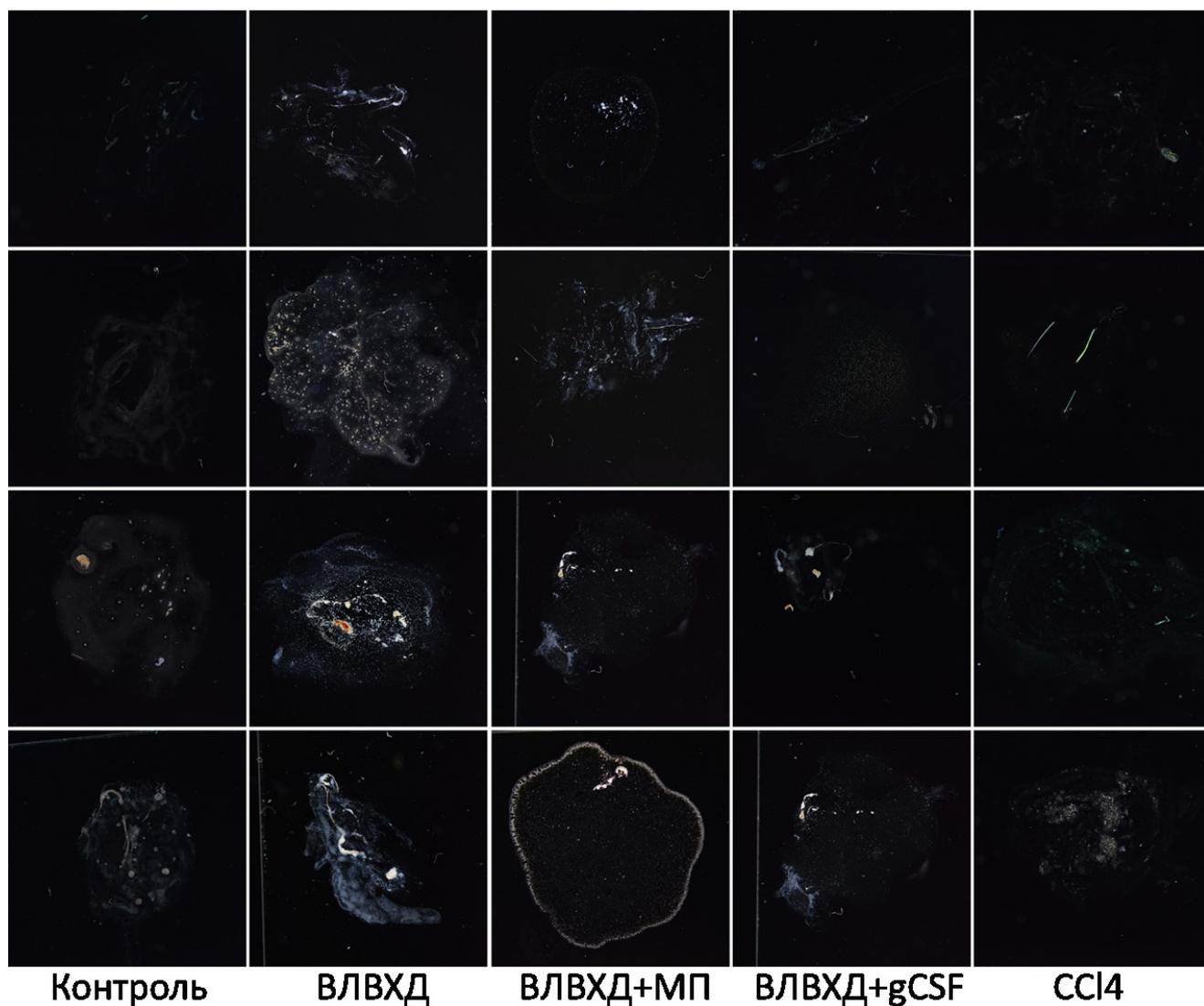


Рис. 3.46. Поляризаційна мікроскопія каменів, у жовчних міхурах лабораторних мишей після 6 тижнів зміненого раціону. Фотографії 4 типових зразків з групи. Макрофотографія, об'єктив Micro Nikkor 1:2.8G

Ми спостерігали зменшення утворення кристалів як за дії МП, так і за дії gCSF (що було неочікуваним ефектом). Водночас типові фібротичні зміни за дії ССІ₄ не супроводжувались ні появою каменів, ні ліпідними депозитами в гепатоцитах, якщо оцінювати за зміною їх площі, спостерігали лише акумуляцію фіброзної тканини (не показано).

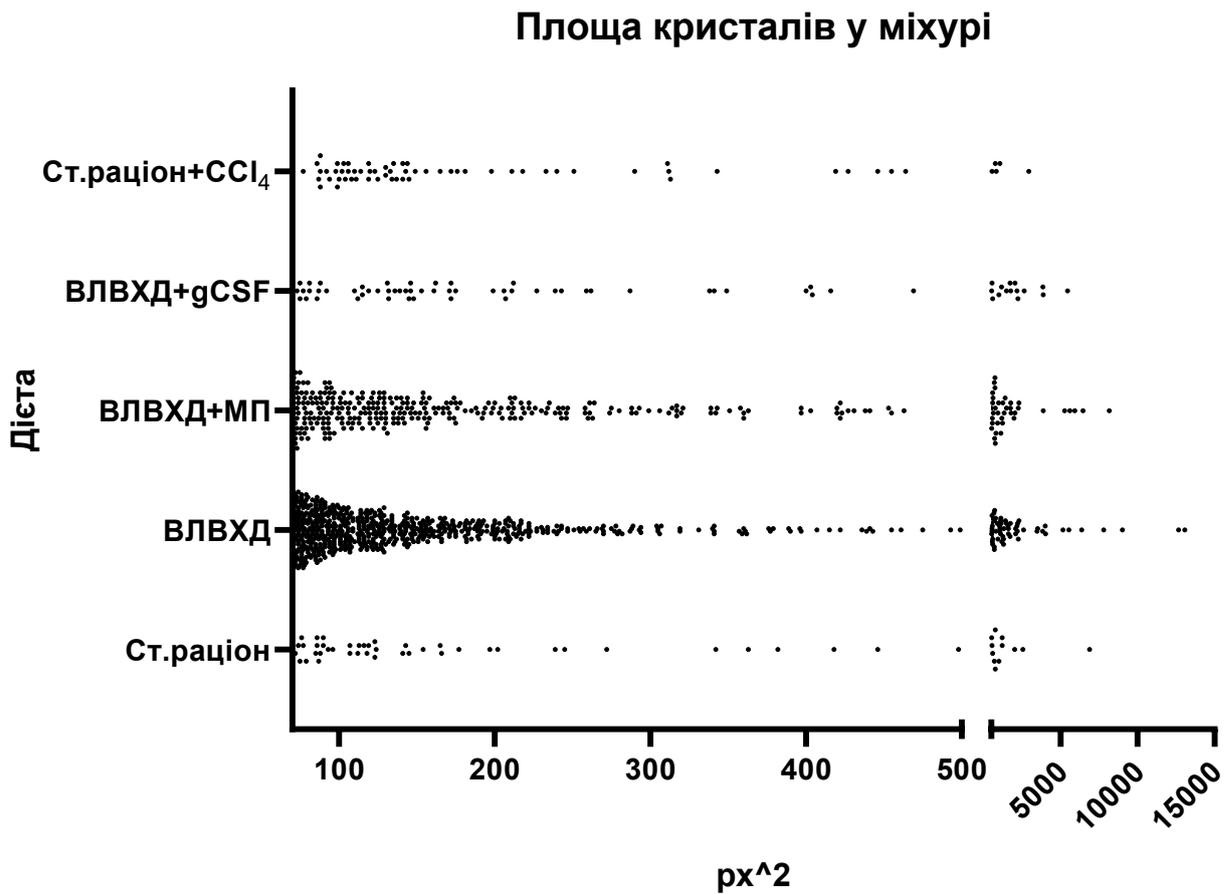


Рис. 3.47. Підрахунок площі кристалів, що заломлювали світло, виділених із жовчних міхурів лабораторних мишей за вказаного раціону упродовж 6 тижнів

Аналіз площі гепатоцитів показав її значне зростання за дії ВЛВХД. В цьому випадку лише дія метопрололу призводила до її суттєвого зменшення, gCSF сприяв широкому діапазону розмірів гепатоцитів (рис. 3.48). Водночас за дії МП у ~30 % тварин ми спостерігали лейкоцитарну інфільтрацію печінки, спленомагалії та інші морфологічні ознаки системного запалення.

Можемо зробити висновок, що хоч МП і ефективно запобігає утворенню каменів в жовчних міхурах, однак він усуває захист, який надають нейтрофіли тканинам печінки від мікрофлори кишківника.

За дії ВЛВХД ми спостерігали як зростання площі гепатоцитів, так і зростання вмісту ліпідів (рис. 3.49), водночас за дії гепарину і ВЛВХД вміст ліпідів у гепатоцитах достовірно зменшився у порівнянні з ВЛВХД ($p < 0.0001$) і наблизився до значень тварин, що перебували на стандартному раціоні.

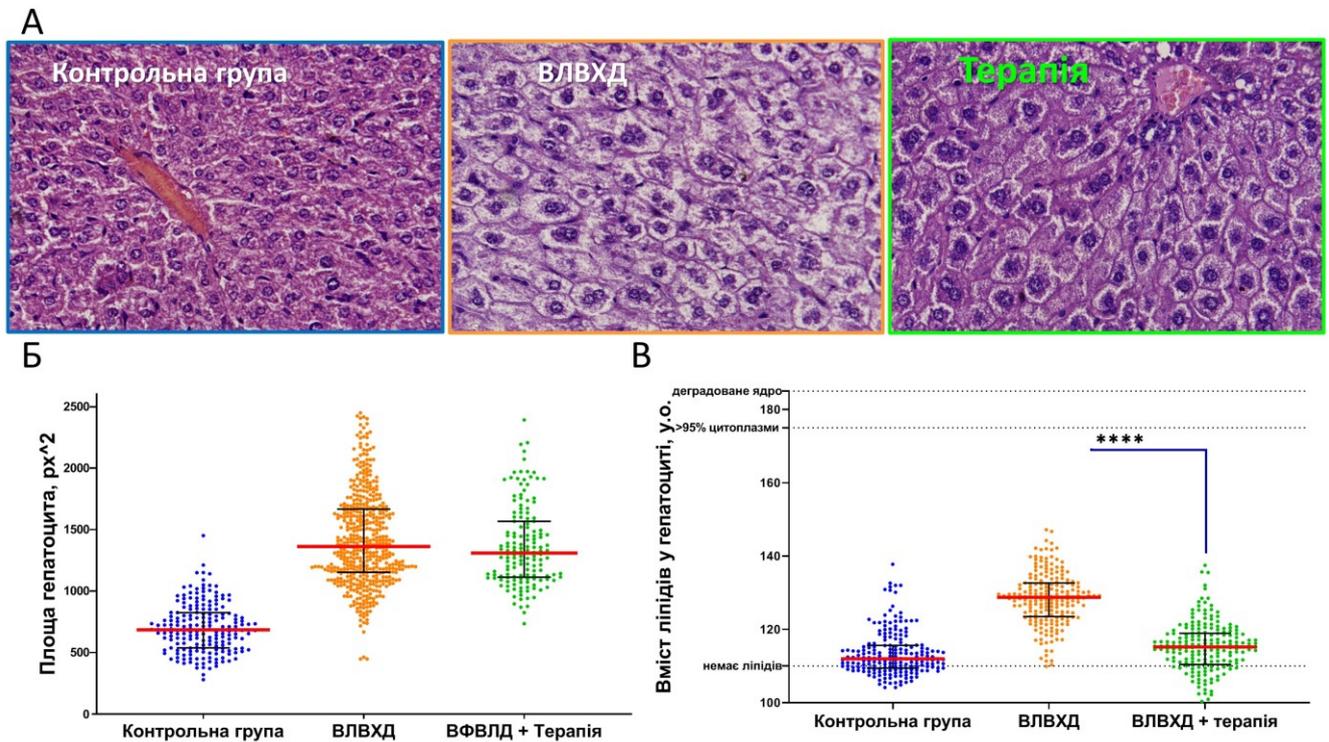


Рис. 3.49. Вплив гепарину на тканини печінки за дії ВЛВХД. А – морфологія тканин печінки, Б – площа гепатоцитів, В – вміст ліпідів у гепатоцитах за стандартного раціону в контрольній групі, дії ВЛВХД та ВЛВХД з терапією гепарином. Фарбування Н&Е, об'єктив 40x 0,95NA

За дії ВФД ми спостерігали зростання вмісту ліпідів у гепатоцитах (рис. 3.50), водночас за дії гепарину і ВФД вміст ліпідів у гепатоцитах достовірно зменшився у порівнянні з ВФД ($p < 0.0001$) і наблизився до значень тварин, що перебували на стандартному раціоні.

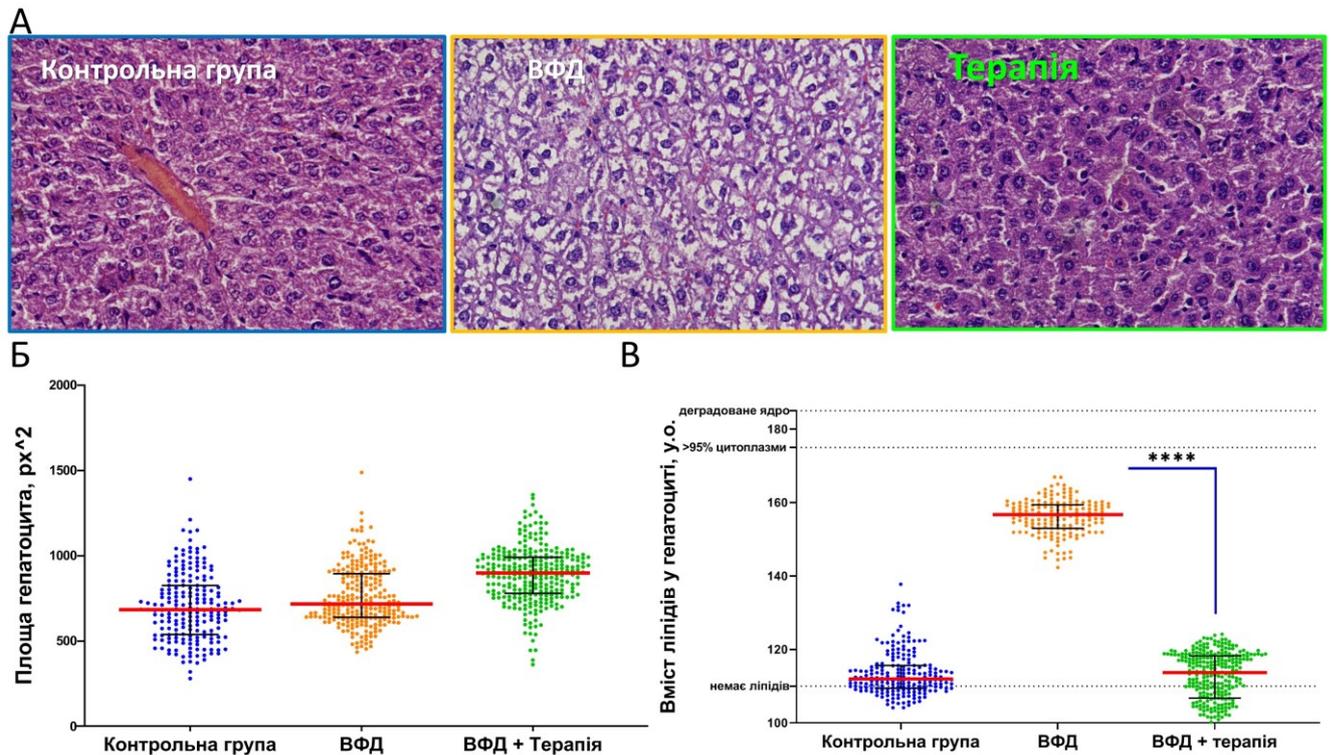


Рис. 3.50. Вплив гепарину на тканини печінки за дії ВФД. А – морфологія тканин печінки, Б – площа гепатоцитів, В – вміст ліпідів у гепатоцитах за стандартного раціону в контрольній групі, дії ВФД та ВФД з терапією гепарином. Фарбування Н&Е, об'єктив 40x 0,95NA

З метою визначення доказових показників фіброзу в тканинах печінки ми розробили надійну систему серологічних параметрів ушкодження печінки в лабораторних мишей та порівняли її з результатами гістологічного аналізу. За основу тесту, ми взяли принцип тесту Siemens ELF – Enhanced Liver Fibrosis™ (Вдосконаленого тесту на фіброз печінки) для людини [112], який визначає наступні специфічні маркери ушкодження тканин печінки, притаманні фіброзним перетворенням: гіалуронову кислоту (ГК), аміно-кінцевий пептид проколагену III (РІІІNP) та тканинний інгібітор металопротеїназ-1 (TIMP-1). Для визначення РІІІNP було використано антитіла компанії Abcam Recombinant Anti-Pro-Collagen III alpha 1 antibody [EPR24257-57] (ab278080), для визначення TIMP-1 використано антитіла Abcam Anti-TIMP1 antibody [EPR16616] (ab179580).

Оскільки для ГК немає комерційно доступних антитіл відповідної видової специфічності, нами були створені необхідні антитіла. Для цього колекцію зразків ГК різних молекулярних мас (Luphar Biotech Co) було кон'юговано з наноад'ювантами, як описано в розділі 2, для утворення антитіл до коронавірусних антигенів, здійснено імунізацію кролів, виділено сироватку та очищено антитіла, перевірено їх афінність. Імуноферментний аналіз здійснювали, як описано в розділі 2.

Перевагою обраного тесту є те, що він виявляє окремі антигени, притаманні патологічному стану – фіброзу печінки, в той час як більшість «печінкових проб» визначають ензиматичну активність шляхом спряжених ферментативних реакцій і за ушкодження печінки вони є неспецифічними. Також при заборі крові в лабораторних тварин є обмеження щодо об'єму крові, який можна отримати, тому неможливо забрати достатню кількість крові повністю виключивши гемоліз, що робить визначення «маркерних» печінкових ензимів недостовірним показником при аналізі зразків сироватки крові тварин. Водночас для імуноферментного аналізу достатньо 5 мкл сироватки, він не дає перехресних реакцій із іншими антигенами, зразки можна проаналізувати усі одночасно на 96-лунковому імунологічному планшеті, що додатково усуває похибку між індивідуальними вимірами.

Визначення вмісту анти-про-колагену III альфа 1, тканинного інгібітора металопротеїназ-1 та гіалуронової кислоти в сироватках крові тварин після 5 тижнів перебування на ВЛВХД представлено на рис. 3.51, де також наведено комбінований індекс фіброзу печінки, розрахований за формулою розробників.

Встановлено, що ВЛВХД призводила до достовірного зростання комбінованого індексу фіброзу, а за дії ВЛВХД та гепарину цей показник зменшувався і достовірно не відрізнявся від значень у тварин контрольної групи на стандартному раціоні. Результати досліджень опубліковано в роботах [169–172].

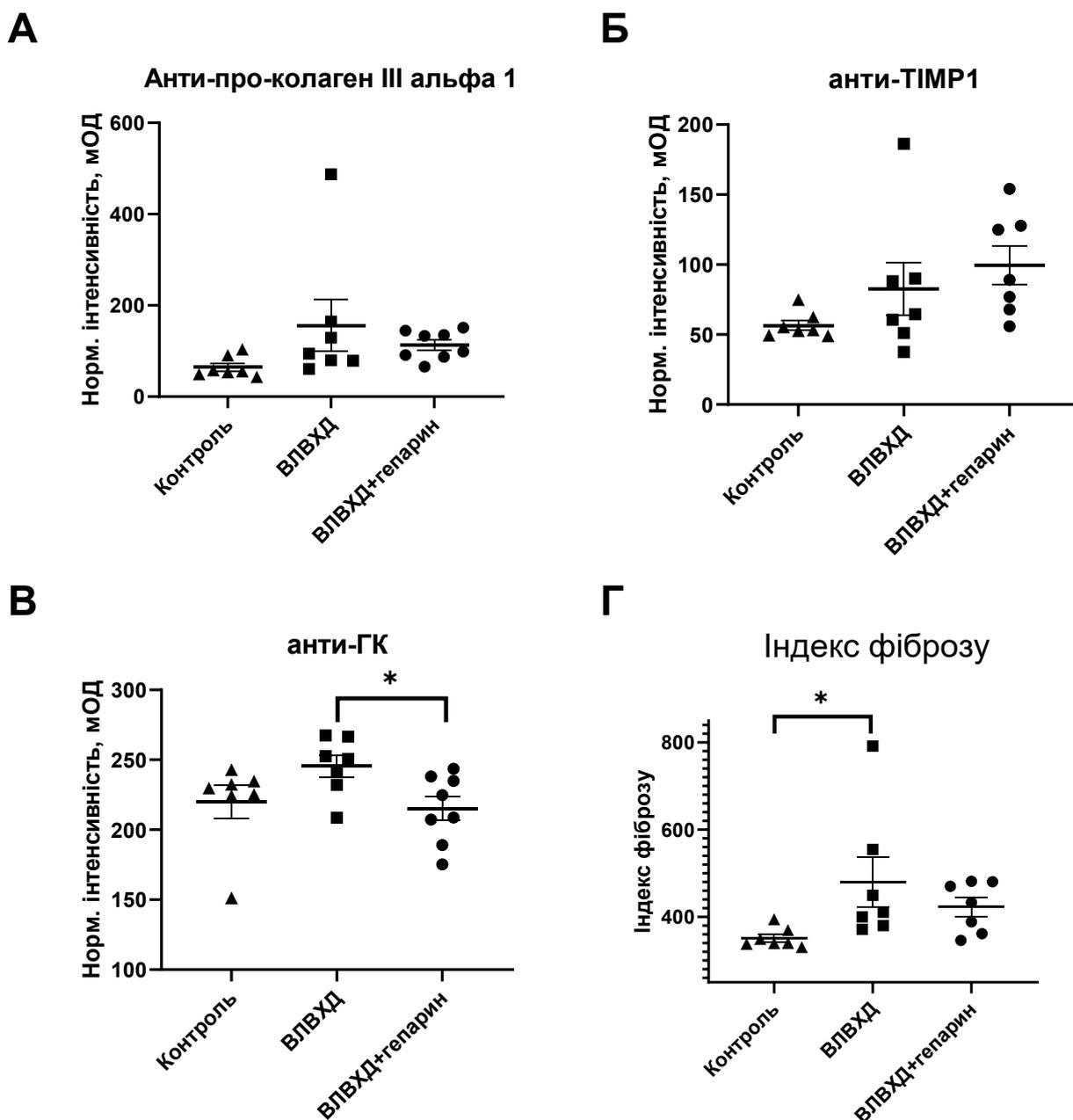


Рис. 3.51. Вміст маркерів, притаманних фіброзу печінки, та розрахований індекс фіброзу печінки, визначений в сироватках лабораторних тварин за ВЛВХД та терапії гепарином

Показники індексу фіброзу печінки розраховані для ВФД та ВФД за терапії гепарином (підшкірні ін'єкції, щоденно) та метопрололу (розчинений у воді), після перебування тварин на такій терапії впродовж 5 тижнів наведено на рис. 3.52. За дії ВФД індекс фіброзу зростав у порівнянні із контрольною групою на стандартному раціоні, проте ці зміни не були достовірними ($p=0.14$), водночас за терапії як

гепарином, так і метопрололом його значення були близькими до значень контрольної групи на стандартному раціоні.

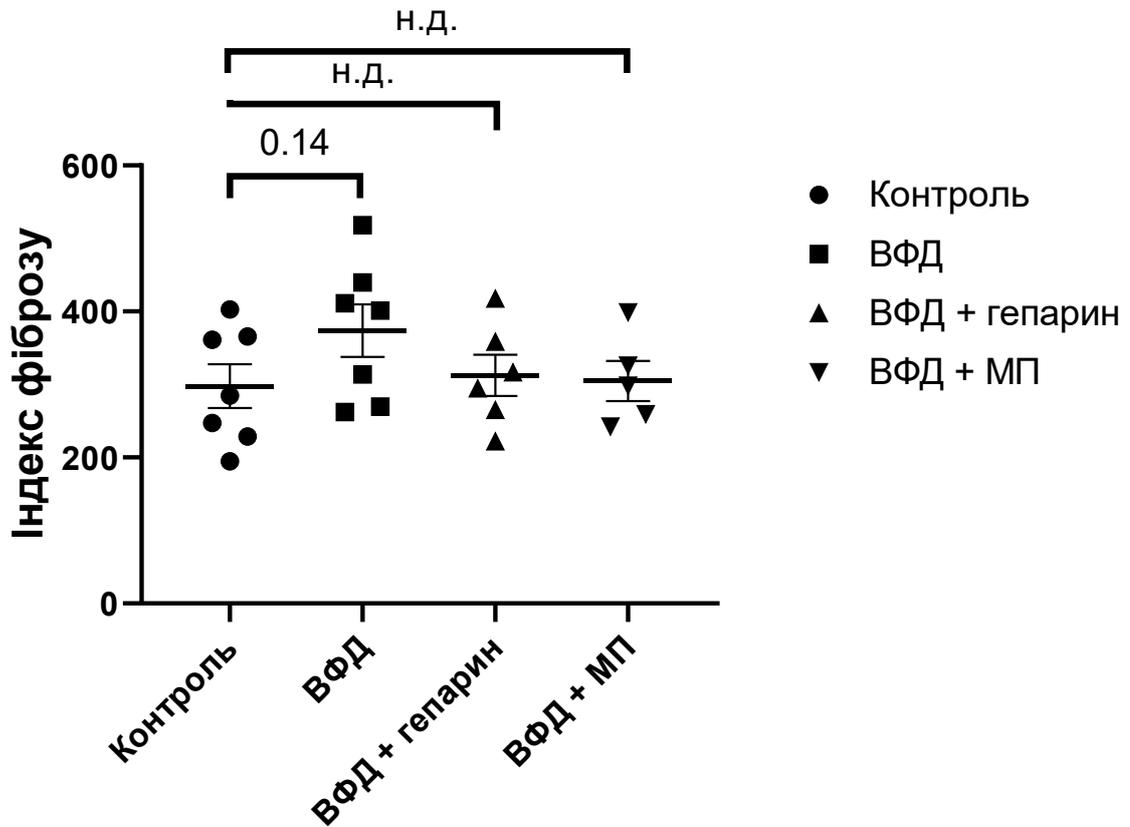


Рис. 3.52. Розрахований індекс фіброзу печінки, визначений в сироватках лабораторних тварин за ВФД та терапії гепарином та метопрололом.

Результати визначення активності еластази нейтрофілів в сироватках тварин на 0 та 35 день експерименту при ВЛВХД за дії гепарину (фраксипарину) представлено на рис. 3.53. ВЛВХД спричиняла значне зростання активності еластази нейтрофілів в крові, проте за щоденної дії фраксипарину таке зростання було достовірно нижчим ($p < 0.05$), ніж при самій ВЛВХД, однак активність все ж була вищою, ніж у тварин контрольної групи на стандартному раціоні.

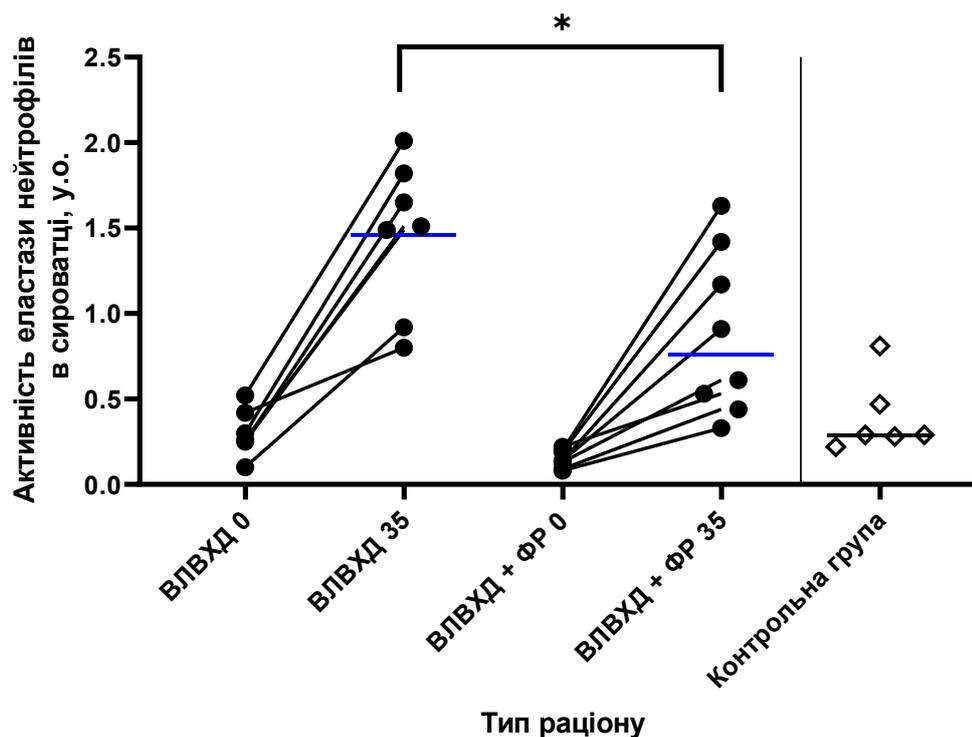


Рис. 3.53. Активність еластази нейтрофілів у сироватці лабораторних тварин за вказаного типу терапії при ВЛВХД. ФР – фраксипарин. Число вказує на день забору зразків

При ВФД спостерігались подібні зміни щодо активності еластази нейтрофілів (рис. 3.54). ВФД спричиняла значне зростання активності еластази нейтрофілів в крові, проте за щоденної дії фраксипарину таке зростання було достовірно нижчим ($p < 0.05$), ніж при самій ВФД, однак активність все ж була вищою, ніж в контрольній групі на стандартному раціоні.

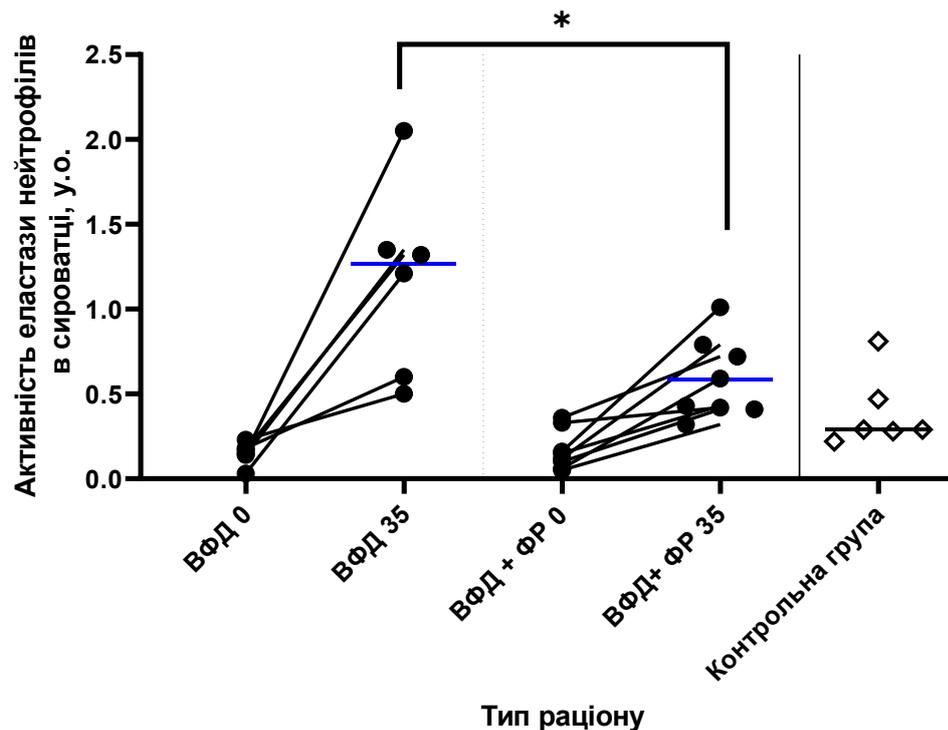


Рис. 3.54. Активність еластази нейтрофілів у сироватці лабораторних тварин за вказаного типу терапії при ВФД. ФР – фраксипарин. Число вказує на день забору зразків

3.1.6.3. Потенційні терапевтичні шляхи впливу на патологічні нейтрофільні гранулоцити

Спрямоване руйнування патологічних клітин нейтрофільної природи за допомогою кон'югатів попередників ліків та холевої кислоти. Зважаючи на схильність нейтрофільних гранулоцитів до активації при взаємодії з молекулами холестерину та холевої кислоти – основними індукторами НАСГ у використаній нами моделі, ми спробували поєднати ці сполуки із сполуками, що цілеспрямовано підвищують рівень АФК в клітині і діють як аутокатализатори їх утворення [173, 174]. Сполуки, які забезпечують посилення рівня АФК за наявності його в клітині, розробляються науковим консорціумом NeutroCure (Neutrocure.eu) під керівництвом проф. А. Мохіра на основі N- алкіламінофероценів. Оскільки АФК у високих рівнях продукуються як пухлинними клітинами, так і нейтрофільними

гранулоцитами, вони будуть першими мішенями для активації даними сполуками при системному введенні.

Наші попередні дослідження вказують на те, що холестерин і холева кислота, взаємодіючи з мембранами нейтрофільних гранулоцитів, активують їх з утворенням нейтрофільних позаклітинних пасток, цей процес включає інтерналізацію ліпідних частинок (або ліпідних молекул) у клітинну мембрану. Тому, досліджуючи протипухлинні сполуки на основі N-алкіламінофероценових проліків, які посилюють утворення активних форм кисню в пухлинних клітинах і, таким чином, знищують їх, ми хотіли поєднати їхній терапевтичний ефект з функцією цілеспрямованої доставки, для створення протипухлинних сполук нового покоління.

З цією метою командою NeutroCure було створено гібридну сполуку, що містила залишок амінофероцену, відповідальний за утворення АФК, залишок холевої кислоти, відповідальний за таргетинг та залишок кумарину, що при від'єднанні забезпечував флуоресценцію (рис. 3.55, А). Проліки досліджували на моделі лейкемії мишей, індукованій мієлоїдними клітинами лінії NK/Ly-RB. Це субклоновані в нашій лабораторії клітини, що походять від лімфоми Немет-Келнера [175] і несуть на собі маркери нейтрофільного ряду. Ці пухлинні клітини експресують високі рівні мієлобластних антигенів Ly6C (рис. 3.55, Б), а також маркерів гранулоцитів, зокрема нейтрофілів, – CD11b, CD16, Ly6G та ферменту еластази нейтрофілів (рис. 3.55, В) [176]. Важливо, що вони не мають маркерів інших ліній мієлоїдного ряду, зокрема CD4 та CD11c. Еластазу нейтрофілів виявляли за розпадом її специфічного флуорогенного субстрату, як описано в розділі 2, активність при цьому блокувалась сівелестатом – специфічним інгібітором еластази нейтрофілів [95, 177].

Отже, запропоновані нами клітини володіли як функціональними ознаками нейтрофілів, так і здатністю до пухлинного росту.

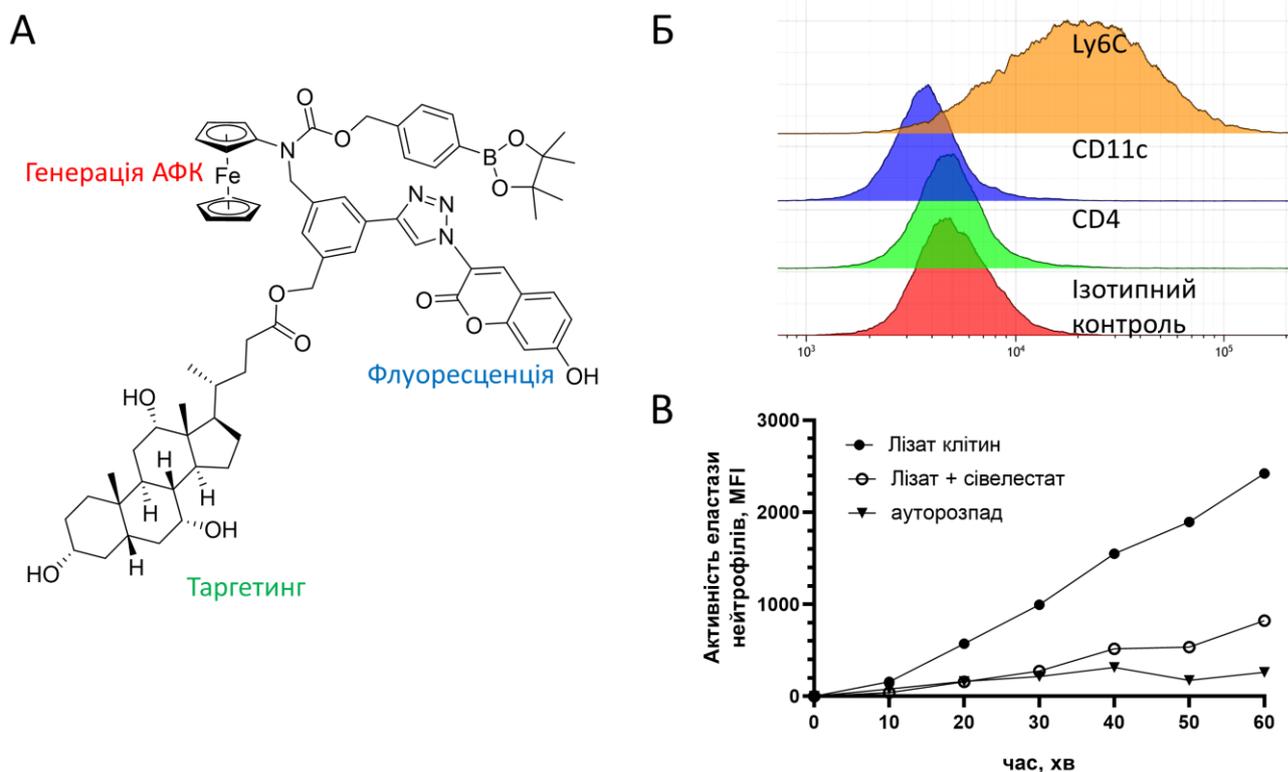


Рис. 3.55. Використання трисайтової гібридної сполуки, що містить групу активатор АФК, здійснює таргетинг за допомогою холевої кислоти та володіє потенційною флуоресценцією при розщепленні (А) для таргетингу пухлинних клітин з високим вмістом маркерів нейтрофільного ряду – Ly6C, низьким вмістом лімфоцитарних антигенів (CD11c, CD4) (Б) та високою ендогенною активністю еластази нейтрофілів (В).

Клітини NK/Ly-RB спільно інкубували з кон'югатом N-алкіламінофероцен-7-гідроксикумарин-холієва кислота, і за допомогою флуоресцентної мікроскопії спостерігали в клітинах флуоресценцію залишку 7-гідроксикумарину. Оцінювали активацію даної сполуки *in vivo* в мишей C57/BL6N, яким інокулювали зазначену клітинну лінію у формі пухлини, що розвивалась в асциті. Вивчаючи асцити на 3 день інкубації, спостерігали характерне жовте забарвлення, притаманне розщепленим компонентам сполуки (рис. 3.56, А). Ми дослідили флуоресценцію рідини асциту до, через 3 год і через 3 дні після введення сполуки тваринам. Спостерігали зростання флуоресценції в середовищі, що свідчить про розпад сполуки та розпад клітин, в яких вона накопичувалась (рис. 3.56, Б). На 3 день ми

забрали асцитні клітини мишей, що зазнавали (рис. 3.56, В) та не зазнавали (рис. 3.56, Г) обробки сполукою і дослідили їх морфологію. Аналізували також флуоресценцію 7-гідроксикумарину (Ch1: $\lambda_{ex} = 290 - 410$ нм; $\lambda_{em} = 415 - 465$ нм). Сигнал локалізувався навколо ядра в області, властивій ендоплазматичному ретикулуму (рис. 3.56). Для візуалізації ендоплазматичного ретикулуму використовували барвник ER-tracker dye (Ch2: $\lambda_{ex} = 530 - 570$ нм; $\lambda_{em} = 570 - 650$ нм), це дало можливість підтвердити колокалізацію сигналу в ендоплазматичному ретикулумі. Потрапляючи в клітини, сполуки викликали підвищення рівня активних форм кисню, якого було достатньо для загибелі клітин, що видно з морфології клітин на рис. 3.56, В.

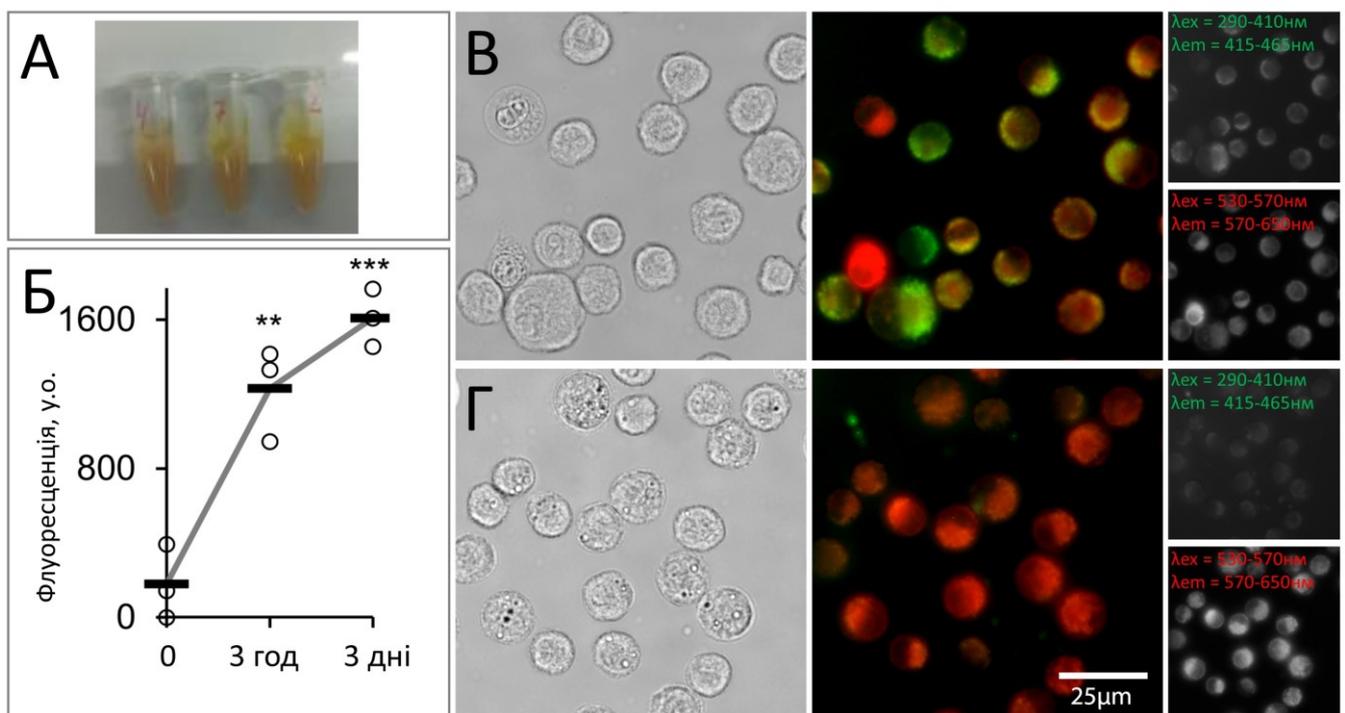


Рис. 3.56. Накопичення гібридного похідного амінофлюороцену, холевої кислоти та гідроксикумарину в асцитній рідині (А) мишей з пухлиною, воно зростало з часом (Б). На клітинному рівні сполука накопичувалась в ендоплазматичному ретикулумі оброблених клітин (В), які за морфологічними ознаками втрачали життєздатність. Г – клітини із тварин контрольної групи. Зелений канал – флуоресценція гідроксикумарину, червоний канал – флуоресценція барвника ER-tracker dye. Фарбування Н&Е, об'єктив 40x 0,95NA

Таким чином, здатність нейтрофільних гранулоцитів взаємодіяти з ліпідами, отриманими з холестерину, такими як холева кислота, може бути успішно використана для цілеспрямованої дії певних сполук на ці клітини. Результати опубліковано в роботах [178, 179]

Вплив іонів натрію на процес утворення НПП. Для пошуку нових можливостей керованого впливу на системний рівень утворенн НПП ми звернули увагу на повідомлення, що цей процес залежить від концентрації солі, зокрема іонів натрію. Адже так звана «західна дієта», багата сіллю, по-різному впливає на вроджену імунну систему. Довгий час вона вважалася фактором ризику при виникненні аутоімунних захворювань [180]. NaCl посилює запальний артрит через індукцію патогенних CD4⁺ Т-клітин-хелперів, які продукують інтерлейкін-17 (IL- 17) [181]. Однак вплив солі на нейтрофіли залишається до кінця не з'ясованим, оскільки багато публікацій подають суперечливу інформацію щодо цього. Повідомлялося, що індукована NaCl гіперосмолярність пригнічує деякі функції лейкоцитів, такі як хемотаксис, фагоцитоз, внутрішньоклітинне знищення бактерій і виробництво супероксиду [182]. Автори [183] вказували, що середовище з високим вмістом солі пригнічує залежне від АФК утворення НПП, в той час як Krampert та співавт. [184] повідомили, що «високий вміст солі» (додаткових 40 мМ NaCl) зменшує міграцію нейтрофілів, дегрануляцію та виробництво АФК без змін у життєздатності клітин або утворенні НПП. У останній публікації наголошено, що ефект додаткових 50 мМ NaCl є залежним від часу та викликає уповільнену активацію нейтрофілів людини. У короткострокових культурах нейтрофілів продукція IL-8 і респіраторний вибух були інгібовані, водночас у довготривалих культурах (час достатній для формування НПП) – вони були збільшені [185].

Дослідження ролі солі є важливим з огляду на тематику нашої роботи, адже зазвичай їжа з високим вмістом ліпідів також містить високий вміст хлориду натрію, однак це не завжди вірно щодо їжі з високим вмістом фруктози. Проте вміст солі відносно легко контролювати, і якщо вплив солі є співмірним з впливом досліджуваного метапрололу (зменшення міграції та екстравазації), ефект сольової дієти може мати суттєвий адитивний вплив до досліджуваних методів терапії.

Іонна сила в організмі ссавців суворо регулюється [186]. Загальна іонна сила в тілі клітин і позаклітинній (тканинній) рідині становить приблизно 150 мМ, що відповідає 300 мОсм/кг. У нирці, яка бере участь в осморегуляції [187], цей осмотичний тиск локально значно перевищується. На шляху сечі від крові до внутрішньої мозкової речовини осмолярність поступово зростає від 300 до 1200 мОсм/кг. Тонічність корегує із зміною відповідних інтерстиціальних просторів [188]. Крім цих осмолярно активних іонів, кістки конститутивно містять багато натрію, адсорбованого на апатиті осмолярно неактивним способом. Відомо, що у запалених тканинах пацієнтів із шкірною інфекцією натрій індуковано накопичується в місці інфекції [189].

Отож, хоча наведені дані свідчать, що наш організм здатний толерувати відносно високі кількості іонів натрію у позаклітинному середовищі, до кінця не з'ясовано, чи підвищує цей натрій місцевий осмотичний тиск.

Ми вивчили вплив гіпертонічного середовища, збагаченого натрієм, на життєздатність нейтрофілів, ядерну морфологію та різноманітну активність цих клітин, зокрема здатність до утворення НПП. Нейтрофільні гранулоцити людини виділяли із периферичної венозної крові здорових донорів у градієнті густини фіколу, як описано в розділі 2. Для цього використали ізотонічне середовище (137 мМ NaCl), помірно гіпертонічне середовище (додаткових 63 мМ NaCl, загалом 200 мМ) та високо гіпертонічне середовище (додаткових 163 мМ NaCl, загалом 300 мМ). Останнє значно зменшувало життєздатність нейтрофілів, сприяло зростанню рівня некротичних, але не апоптичних нейтрофільних гранулоцитів (до понад 50 % від загальної кількості за умови культивування в середовищі з сироваткою упродовж 4 годин). Для аналізу впливу сольового середовища на утворення НПП ми індукували їх утворення за допомогою форболміристилацетату (РМА) за вмісту NaCl 137, 200 та 300 мМ, як контроль використовували ЗФР. За стимулювання РМА утворення НПП зменшувалось уже при вмісті NaCl 200 мМ, у порівнянні з ізотонічним середовищем (рис. 3.57).

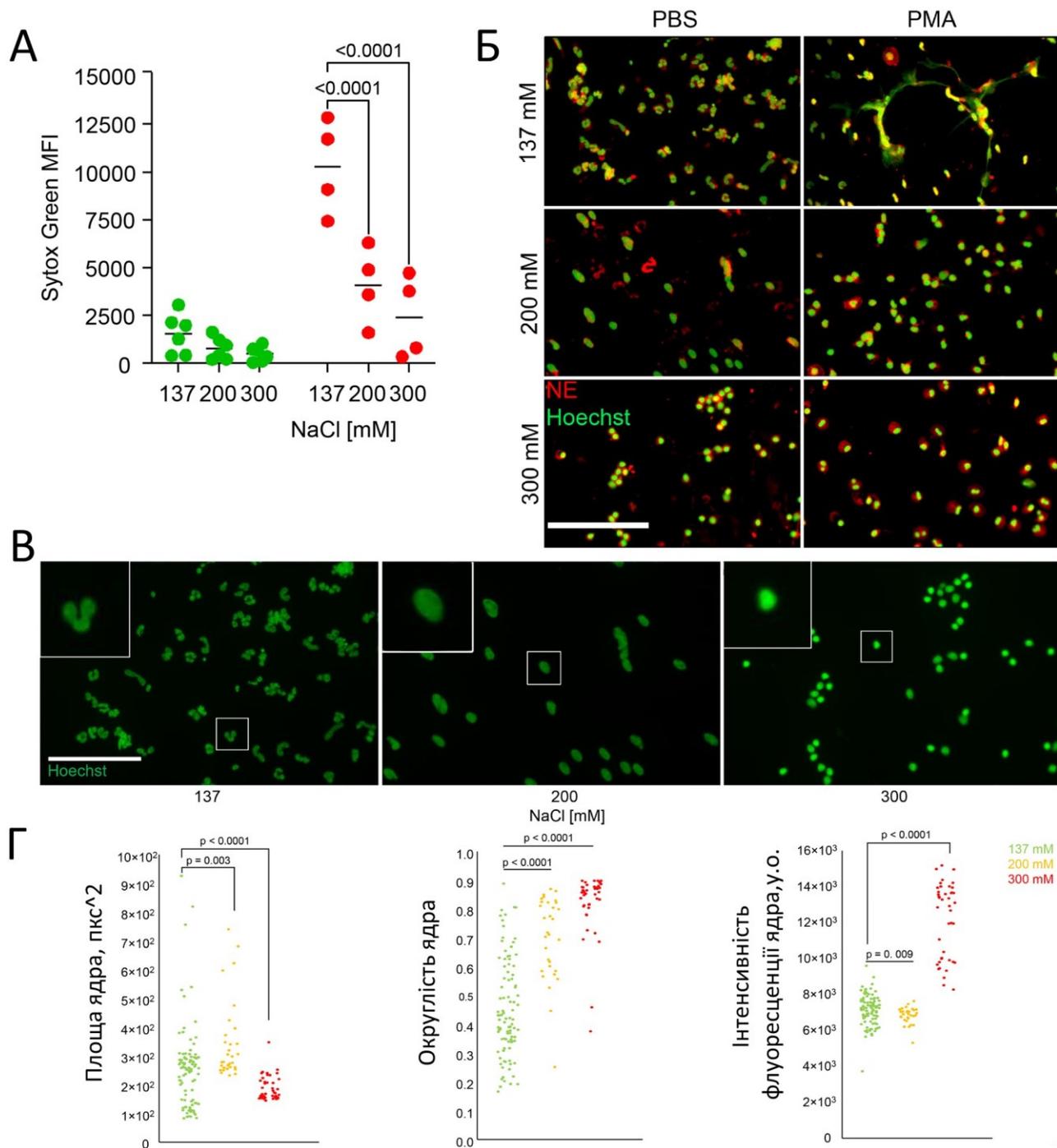


Рис. 3.57. Вплив гіпертонічного середовища на морфологію нейтрофільних гранулоцитів. Утворення НПП, виявляли за фарбування Sytox Green (А) та морфологією ядра і NE (Б) у нестимульованих PBS та стимульованих PMA нейтрофільних гранулоцитах периферичної крові за дії зазначеної кількості солі NaCl. Наведено морфологію ядер (В) та їх кількісний обрахунок (Г) нестимульованих нейтрофілів за вмісту зазначених концентрацій NaCl в середовищі. Об'єктив 20x 0,75NA

Для підтвердження інгібування утворення НПП ми використали флуоресцентну мікроскопію з імуноцитохімічним визначенням еластази нейтрофілів (NE) у присутності Hoechst33342 для дискримінації морфології ядер. Проаналізували ядерну морфологію та внутрішньоклітинну колокалізацію ДНК та NE, а також морфологічні ознаки нестимульованих нейтрофілів (рис. 3.57, А, Б). Аналізуючи площу, округлість та вміст ДНК у ядрах нейтрофілів, можемо зазначити, що при 200 мМ клітини втрачають свою сегментацію ядер, а за високогіпертонічних умов (300 мМ) ядра конденсуються і виявляють посилення флуоресценції барвника Hoechst33342 (рис. 3.57, В, Г).

Отже, високий вміст NaCl у позаклітинному середовищі стимулює зменшення рівня формування НПП у ізольованих нейтрофілах периферичної крові, інкубованих у середовищі з контрольованим рівнем натрію.

Ми вирішили використати виявлене явище, щоб перевірити, чи матиме воно місце *in vivo*. Для цього нами була запропонована високосольова дієта (ВСД), при якій використовувався лабораторний корм з 4 % NaCl в гранулах (ssniff Spezialdiäten GmbH, E15431-34) та 0,9%-ий розчин NaCl замість води. Використання такого корму не дозволило нам відтворити ВЛВХД та ВФД, тому ми обрали іншу «класичну» модель тканинної патології, спричиненої НПП – ревматоїдний артрит внаслідок трансферу сироватки артритних мишей К/ВхN здоровим двомісячним мишам лінії С57BL/6J [190, 191]. Запалення після трансферу сироватки або її основного прозапального компонента, – антитіл IgG до глюкозо-6-фосфат ізомерази (G6PI) із артритної трансгенної миші лінії К/ВхN, спричиняється антитілами до G6PI [192]. В цій моделі нейтрофільні гранулоцити є ключовою ланкою патогенезу захворювання [193]. Сироватку мишей К/ВхN отримали з лабораторії аутоімунних захворювань Університетської клініки м. Ерланген.

Дві групи мишей перебували на СД або ВСД упродовж 43 днів (на день 1 індукували утворення артрити). Ми спостерігали запалення суглобів, притаманне даній моделі. На 43 день ми забирали запалені тканини лапок та аналізували їх гістологічно, виявляючи НПП за позаклітинною ДНК, еластазою нейтрофілів (NE)

та цитрулінованим гістоном Н3 (citH3). Між зап'ястковими кістками ми виявляли позаклітинну ДНК, яку за ко-локалізацією із citH3 ідентифікували як НПП (рис. 3.58). Також ми спостерігали інтактні нейтрофіли, що інфільтрували зап'ясткові кістки тварин на ВСД. Кількісна оцінка інфільтратів, подібних за розмірами кісток мишей на СД та ВСД, виявила більшу кількість клітин, позитивних за еластазою нейтрофілів у тварин на ВСД, а також більшу інтенсивність експресії NE на окрему клітину (рис. 3.58). Ці дані свідчать про зменшення утворення НПП за ВСД.

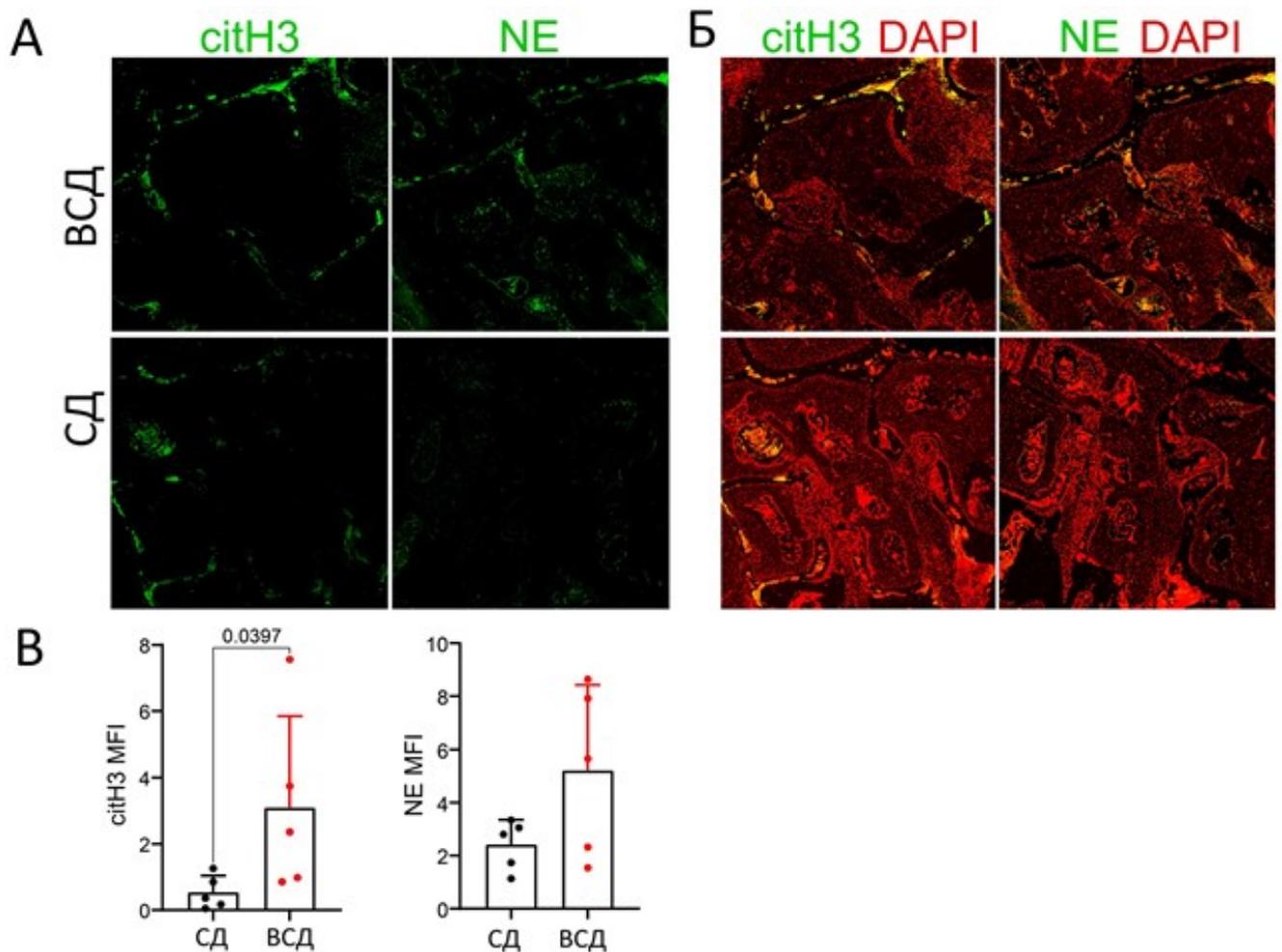


Рис. 3.58. Вплив високосольової дієти на утворення НПП та інфільтрацію нейтрофілів у запаленні тканини навколо кісток зап'ястку в моделі артриту мишей. Імуногістохімічний аналіз на виявлення NE та citH3 (А), поєднаний з фарбуванням ядер за допомогою барвника DAPI (Б). В – наведена кількісна оцінка інтенсивності флуоресценції антитіл до цитрулінованого гістону Н3 та еластази нейтрофілів. Об'єktiv 20x 0,75NA

Проведене нами дослідження вказує на те, що вплив високої концентрації натрію можна відтворити *in vivo* у моделі високосольової дієти. Це важливо для врахування вмісту NaCl у раціоні за розвитку запальних процесів, спричинених НПП. За отриманими результатами подано до друку статтю. Приклад використання екстерналізованої еластази нейтрофілів опубліковано в роботі [194].

Отже, шляхом пригнічення агрегації НПП нам вдалось зменшити рівень циркулюючої еластази нейтрофілів, зменшити ступінь розвитку фіброзу печінки та зупини патологічні зміни в гепатоцитах печінки лабораторних тварин. Очевидно, що зменшення агрегованих НПП зупиняє процеси мікрооклюзії в печінці та витоку жовчі в тканину печінки, що є відомими ушкоджуючими чинниками в розвитку печінкової патології.

Отримані нами дані мають значне як теоретичне, так і практичне значення. Нами достовірно встановлено і апробовано на різних моделях можливість використання фармацевтично доступних інгібіторів, здатних пригнічувати утворення агрегатів НПП чи екстерналізації нейтрофільних гранулоцитів, або їх поєднання. Ці результати можуть бути відносно швидко імplementованими в клінічну практику з метою запобігання наслідків ушкодження тканин печіни природними нанокристаллами, що утворюються в організмі за умови високохолестеринової та високофруктозної дієт. Основні результати, опубліковано в роботах [115, 138, 169, 195–198].

3.2. Використання НПП для керованого посилення імунної відповіді

У 2016 р. було показано, що взаємодія окремих видів НЧ із нейтрофільними гранулоцитами стимулює утворення НПП [4]. Цей процес веде до самообмеженої запальної реакції [25] і може використовуватись для мобілізації імунної системи організму, зокрема до утворення антитіл на антигени, які виявляються в ділянці утворених НПП. Зважаючи, що нейтрофільні гранулоцити є вагомими модуляторами хронічних субгострих запальних процесів, ми вирішили використати явище індукції утворення НПП для керованого утворення імунної

відповіді. Особливої актуальності набуло це завдання в часі пандемії коронавірусу, коли проблема пошуку вакцин зіткнулася з гострою потребою у швидких методах індукції імунної відповіді.

Для дослідження взаємодії екзогенних НЧ з НПП ми використали модель повітряної кишені у лабораторних мишей.

3.2.1. Використання моделі повітряної кишені для дослідження формування НПП за дії наночастинок. Перше використання моделі повітряної кишені для вивчення запалення у щурів було описано більше ніж півстоліття тому [199]. Гістопатологічні дослідження показали, що формування кровоносних судин і механічного бар'єру є ідеальним на 6 день, а інфільтрація імунними клітинами оптимальна через 24 години після введення досліджуваного продукту [141, 200, 201]. Моделі повітряних кишень використовували для дослідження механізмів дії препаратів, фармакокінетики [202], індукції або інгібування ферментів [203, 204], місцевої доставки лікарських засобів [205], ангиогенезу [206] та міграції клітин [204]. Поступово ця модель стала стандартним тестом, який дозволяє краще зрозуміти участь різних факторів у розвитку запальних процесів.

Гістологічно порожнина повітряної кишені вистелена напівпрозорою мембраною, що складається із колагенових волокон з видовженими фібробластними клітинами. Цей шар називають внутрішнім вистеленням повітряної порожнини. Між фібробластними клітинами знаходяться мононуклеарні фагоцити і невелика кількість поліморфноядерних клітин. Іноді у цьому шарі виявляють кілька розкиданих видовжених мастоцитів. Між внутрішньою вистилкою і дермою шкіри верхня стінка містить тонкий шар скелетних м'язів. Мастоцити рідко зустрічаються у цьому шарі. Мастоцити неправильної форми знайдені поблизу щільних колагенових волокон між волосяними фолікулами, вони концентруються ближче до епідермісу [207].

Модель повітряної кишені знайшла ефективне використання у дослідженнях взаємодії з організмом тварин нанокompatитів – природних кристалів моноурату натрію [25], нанодіамантів та полістирольних НЧ [4].

Завданням роботи було створити модель досліджень, яка б забезпечувала можливість стандартизованої оцінки взаємодій НЧ та їх секвестрування нейтрофільними позаклітинними пастками. Дослідження було проведено з використанням описаної моделі повітряної кишені [207] у мишей. Щоб оцінити формування агрегованих НПП навколо НЧ, на першому етапі ми використали мікро- та наночастинки, для яких було описано індукцію утворення НПП, зокрема нановолокна оксиду алюмінію ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ) [59]. Також використали комерційно доступний алюміній гідроксид ($\text{Al}(\text{OH})_3$), аморфну форму та синтезовані і люб'язно надані компанією SilaNanotechnologies (США) нановолокна оксиду алюмінію ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ), а також відносно інертний графен оксид.

Схема запропонованого нами експерименту з використанням моделі повітряної кишені представлено на рис. 3.59.

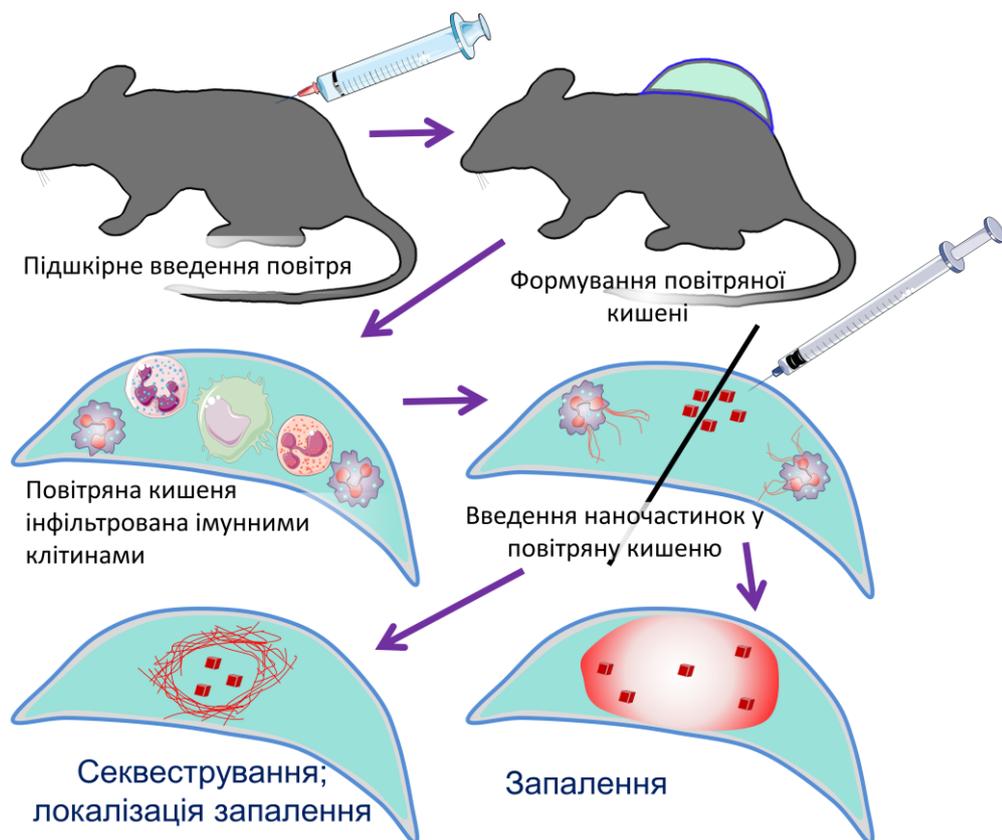


Рис. 3.59. Схематичне зображення використання моделі повітряної кишені для визначення здатності нейтрофілів секвеструвати/локалізувати введений матеріал. Повітряна кишеня формується шляхом підшкірного введення стерильного повітря. Імунні клітини інфільтрують утворену структуру. На п'ятий день у сформовану кишеню інокують досліджувані частинки

Аналіз клітинного вмісту повітряної кишені (рис. 3.60) показав, що на 6 день від початку експерименту лейкоцити інфільтрують повітряну кишеню. Крім нейтрофільних гранулоцитів ми виявили значну кількість еозинофілів, моноцити та мастоцити, які також беруть участь у розвитку запального процесу. Нейтрофіли у повітряній кишені зазнавали активації та утворювали нейтрофільні позаклітинні пастки. Етапи формування останніх представлено на рис. 3.60, Б-Г.

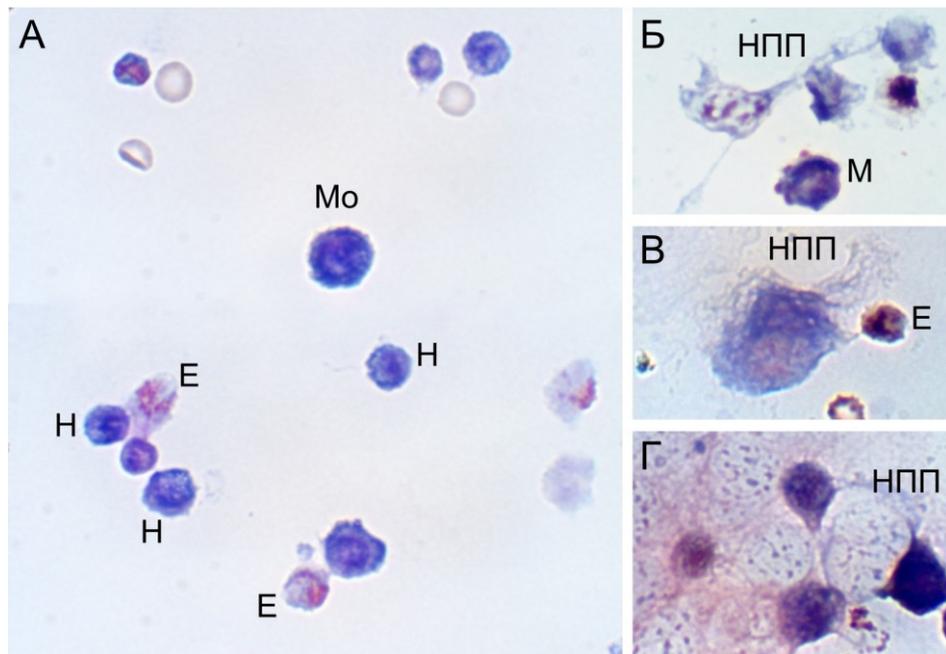


Рис. 3.60. Клітинний вміст повітряної кишені. Підшкірна ін'єкція повітря призводить до розвитку запалення та міграції лейкоцитів у сформовану кишеню (А). Нейтрофільні гранулоцити активуються та формують нейтрофільні позаклітинні пастки (НПП) (Б-Г). Мо – моноцит, Е – еозинофіл, Н – нейтрофіл, М – мастоцит. Фарбування за Романовським, об'єктив 90x 1,35NA

У випадку ін'єкції графен оксиду відбувалося заповнення останнім повітряної кишені та виникала незначна еритема (рис. 3.61, Б). Проте формування НПП не відбувалось. Як негативний контроль використовували фізіологічний розчин (рис. 3.61, А).

Як з $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ, так і з $\text{Al}(\text{OH})_3$ ми спостерігали захоплення введених сполук алюмінію та формування агрегованих НПП (рис. 3.61, В, Г) навколо них. Проте капілярні пошкодження та набряки були менш помітні при введенні $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ (рис. 3.61, В) у порівнянні із $\text{Al}(\text{OH})_3$ (рис. 3.61, Г).

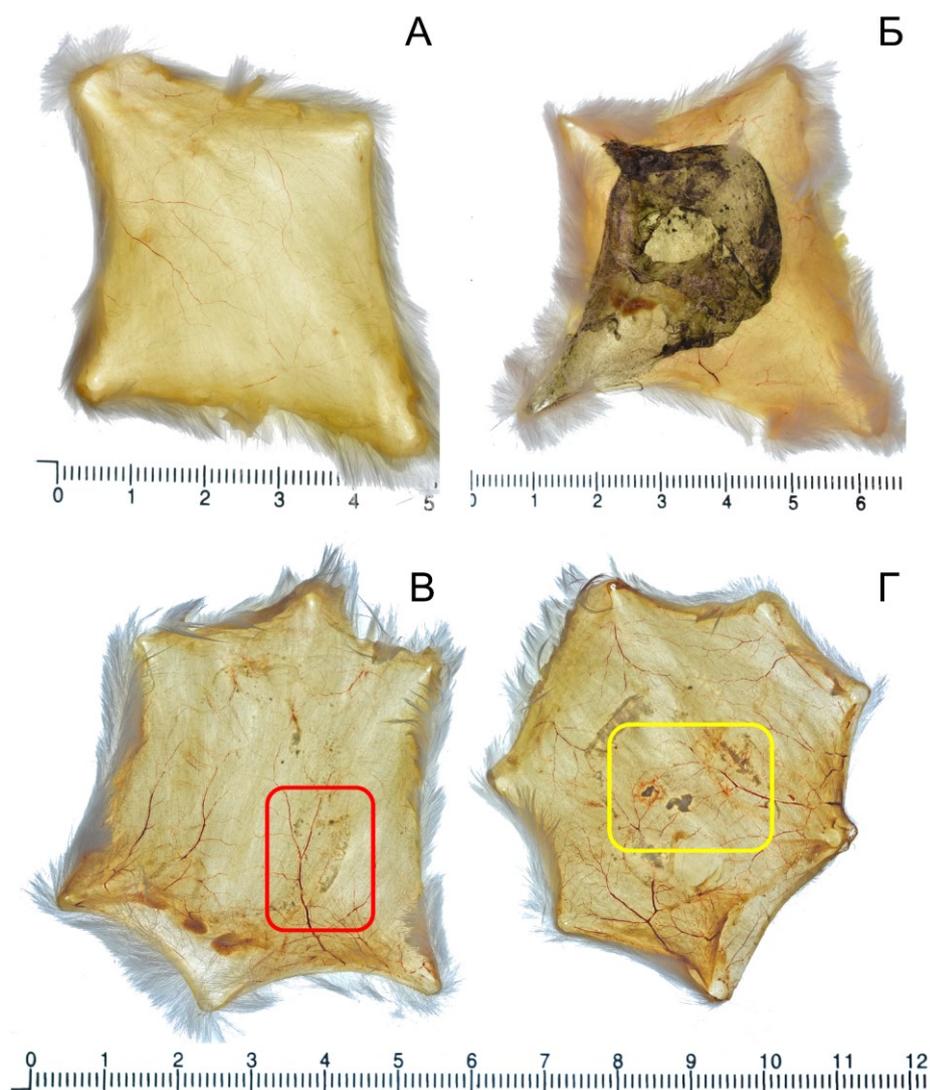


Рис. 3.61. Утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у повітряній кишени після ін'єкції: А – фізіологічного розчину (негативний контроль); Б – розчину графен оксиду; В – $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ; Г – $\text{Al}(\text{OH})_3$ у фізіологічному розчині

На основі отриманих даних ми зробили висновок, що модель повітряної кишени дозволяє ефективно і швидко оцінювати здатність імунних клітин, зокрема нейтрофілів, секвеструвати окремі частинки, як це показано для нанокмполітів алюмінію, але не для інертних частинок графен оксиду. Згодом вчені показали [208], що серед інших алотропних модифікацій вуглецю нанодіаманти є найбільш імуногенними формами, що активують НПП, найбільший вплив на активацію НПП чинять часточки розміром 10 нм [4, 209]. Застосування моделі повітряної кишени для оцінки здатності імунних клітин локалізувати чужорідні НЧ описано нами в роботах [210, 211].

3.2.2. Утворення імунної відповіді на рекомбінантні антигени коронавірусів шляхом стимулювання утворення НПП. Важливим завданням в умовах епідемії було використати НПП як посилювач імунної відповіді для створення тваринних моделей із стійкою імунною відповіддю до коронавірусу SARS-CoV-2. Ці моделі є необхідними не лише для дослідження імунної відповіді до вірусу, а й для пошуку шляхів використання НПП для посилення цієї відповіді та оцінки перехресного імунітету щодо вірусів. Зазначимо, що на момент виконання роботи не існували вакцини від коронавірусу SARS-CoV-2, які можна було б використати в модельних дослідженнях.

Зокрема, ми прагнули отримати імунну відповідь до RBD домену Spike білка SARS-CoV-2, для цього нам була необхідна повністю згорнута та неповністю згорнута – частково денатурована форма білка з великою молекулярною масою, а також до унікальної послідовності в складі RBD домену Spike білка SARS-CoV-2, яка б не зустрічалась в інших коронавірусів. Дані білки, використані у дослідженні, були синтезовані ТОВ «Експлоджен», Львів, Україна.

3.2.2.1. Пошук крос-реактивних антигенів коронавірусів. Коронавіруси володіють кількома спільними білковими ділянками, означеними як спайк-білок (S) на їхній поверхні, при цьому субодиниця S1 розпізнає і зв'язується з клітинним рецептором, тоді як субодиниця S2 опосередковує злиття вірусів і клітинних мембран. Постає питання: чи надасть зараження одним коронавірусом резистентність до інших коронавірусів? Адже перехресна імунна відповідь широко використовується в імунотерапії, – так імунізація антигеном коров'ячої віспи забезпечує імунітет проти натуральної [212]. Пошук такої ділянки, яка б володіла імуногенністю між різними коронавірусами, найбільш імовірно забезпечив би і імунітет проти штамів коронавірусів, які постійно з'являлись упродовж 2020–2022 років.

Коронавіруси, такі як збудники Близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV), важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV-1) та нещодавно утвореного вірусу SARS-CoV-2, мають спільні білкові ділянки, які беруть участь у розпізнаванні клітин-господаря. Генوم SARS-CoV-2 (розміром

30 кБ) кодує великий неструктурний поліпротеїн (ORF1a/b), який додатково протеолітично розщеплюється до утворення 15/16 білків, 4 структурних білків та 5 допоміжних білків (ORF3a, ORF6, ORF7, ORF8 та ORF9). Чотири структурні білки складаються з поверхневого глікопротеїну (S) або спайк-білка, мембранного (M) білка, оболонки (E) і нуклеокапсидного (N) білка, які є важливими для збірки та зараження SARS-CoV-2. Структура геному MERS-CoV кодує 10 білків; два поліпротеїни-реплікази (відкриті рамки зчитування [ORFs] 1ab та 1a), три структурні білки (E, N та M), поверхневий (спайковий) глікопротеїн (S) та п'ять неструктурних білків (ORF 3, 4a, 4b та 5) [213, 214].

Поверхневий глікопротеїн (S) відіграє ключову роль у опосередкуванні прикріплення вірусу та злиття і справді присутній у всіх коронавірусах, здатних інфікувати людину. S білки можуть бути розщеплені протеазами-господарями до N-кінцевої субодиниці S1 та мембранно пов'язаної C-кінцевої області S2. Для того, щоб зв'язатись та використати рецептор клітини-господаря, рецептор-зв'язуючий домен (RBD) субодиниці S1 зазнає конформаційних змін, які тимчасово приховують або експонують детермінанти зв'язування рецепторів [215, 216]. Регіон Heptad Repeat 1 (HR1) у субодиницях S2 утворює гомотримерну структуру, оголюючи 3 висококонсервативні гідрофобні борозни на поверхні, що призводить до зв'язування 3 областей Heptad Repeat 2 (HR2) та утворення структури шестиспиральних пучків (6-HB). 6-HB відповідає за близьке наближення вірусних мембран і мембран господаря та їх подальше злиття. Зв'язування доменів HR1 та HR2 утворює шестиспиральний пучок 6-HB, необхідний для злиття з клітинною мембраною господаря.

Таким чином, частини домену HR2, що специфічно зв'язують HR1, можна розглядати як ідеальну стратегію коронавірусного інгібітора, що запобігає проникненню вірусу в клітину [217]. Подальша оптимізація пептидної послідовності дозволила виявити пан-коронавірусні інгібітори, такі як EK1 [215], здатні інгібувати псевдовірусну інфекцію SARS-CoV-19 [218].

Структура HR2 погано охарактеризована під час кристалографічної оцінки через високий рівень гнучкості [219]. На відміну від високомутабельного рецептор-зв'язуючого домену, домени HR1 та HR2 є дуже консервативними між

коронавірусами, тому утворюють ідеальну мішень для нейтралізації вірусу та формування імунітету. Оскільки домени HR2 та HR1 зливаються та експонуються на поверхні після розщеплення S білка, ми очікували, що вони будуть високо імуногенними.

Ми передбачали, що ця структурна подібність може призвести до вироблення перехресно реактивних антитіл та захисту від інших коронавірусів у разі зараження одним з видів вірусу. Зважаючи на уже наявні на той час знання про імуногенні ділянки антигену вірусу MERS ми перевірили, чи викликає інфекція вірусом SARS-CoV-2 вироблення антитіл, які також розпізнають антигени вірусу MERS. Адже, якщо твердження є вірним, справедливим буде і зворотній процес, в такому випадку нещодавня інфекція коронавірусами – збудниками застуди, надаватиме потенційний захист від COVID-19. А виявлені крос-реактивні ділянки можуть стати мішенню для вакцини, яка захищатиме від наявних та потенційних мутованих форм коронавірусів.

Як ми вже зазначали, повна кристалографічна структура домену HR2 SARS-CoV-2 залишалась в час досліджень недоступною через конформаційні зміни та проблеми стабілізації [216] (рис. 3.62, А). За допомогою алгоритму SEQATOMS [220] ми визначили, що найбільш повною структурою відповідної області, що містить визначені атомні координати, є та, яку запропонували Уолс та співавт. [221], а саме модель для перебудови HR1 HR2 та розгортання, що супроводжує потрапляння вірусу в клітини господаря для інших коронавірусів. Ця структура наочно демонструє вплив доменів HR2 на клітинне зв'язування у тримерній (рис. 3.62, Б) та мономерній формі (рис. 3.62, В). Для оцінки перехресної реактивності ми обрали HR2-специфічний пептид спайкового білка MERS-CoV, який, як повідомляється, має високий імуногенний потенціал [222–224]. Дані щодо його імуногенності наведено вище. Відібраний пептид HR2 спайк білка вірусу MERS (зображений жовтим, рис. 3.62, Г, використовуючи кристалічну структуру 4NJL_A, депоновану в базу PDB [225]), поділяє значну подібність у 3D-структурі між (єдиною) відомою кристалічною структурою домену HR2, що розгорнувся (рис. 3.62, В) та пан-коронавірусним інгібіторним пептидом EK1 (використовуючи кристалічну структуру 5ZVK_a [215], рис. 3.62, Д). Аналіз BLAST для білка

виявляє 46 % ідентичності та 76 % подібності в амінокислотній послідовності пептиду MERS з відповідним пептидом білка SARS-CoV-19 (ID послідовності [QKJ68605.1](#)) (рис. 3.62, Е).

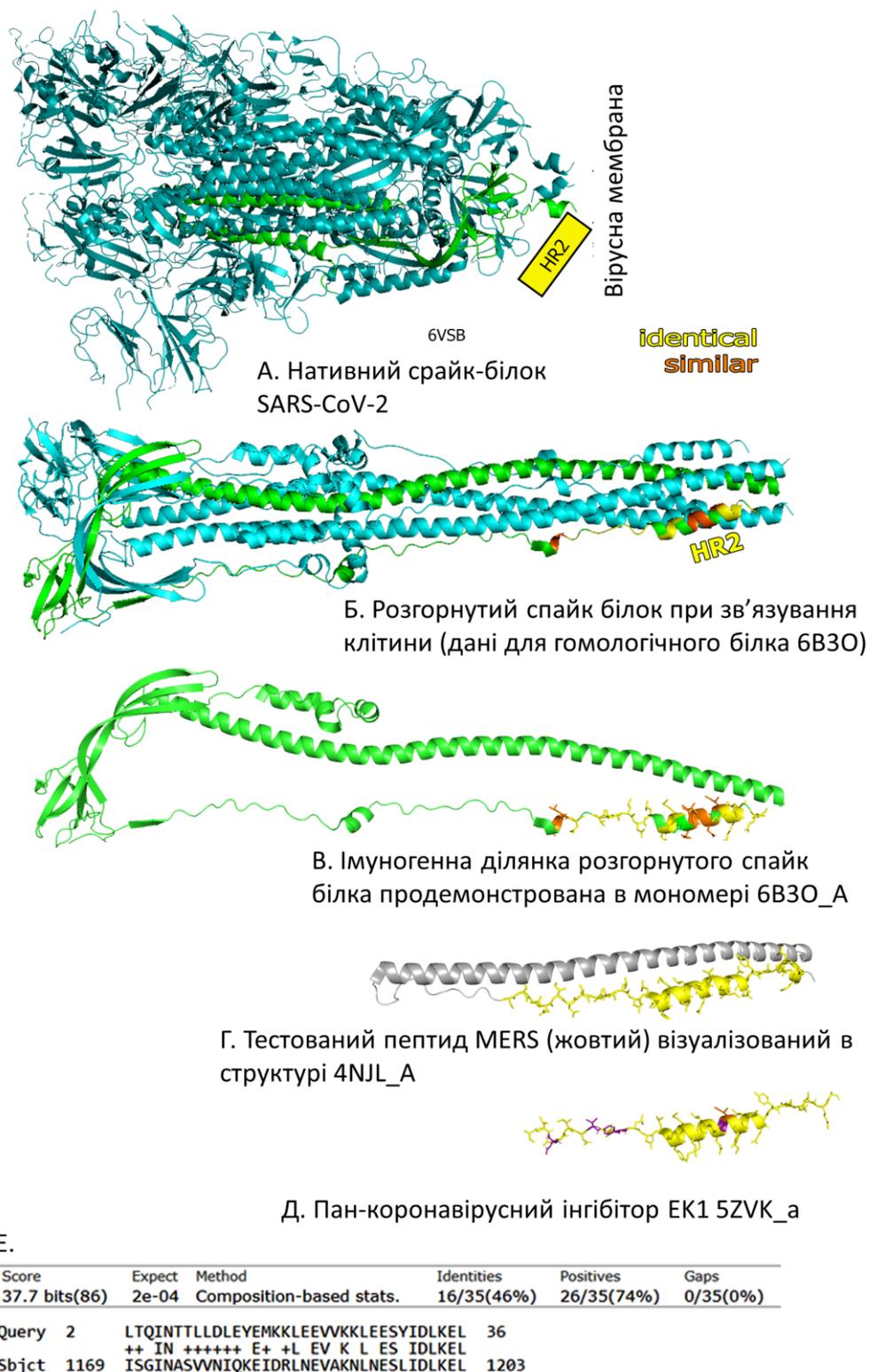


Рис. 3.62. Подібність ділянок HR2 між різними коронавірусами. А – зображення спайк білка S1 SARS-CoV-2. Б – S1 при взаємодії з клітиною

господаря: відбуваються конформаційні зміни в тримері, оголюючи раніше приховані області домену HR2 [216]. В – мономерна частина (Б), експоновано домен зі структурною подібністю (жовтий – ідентичні, помаранчевий – подібні амінокислоти) щодо відповідного пептиду MERS, зображеного на (Г) та (Д). Аналіз білків BLAST щодо використовуваного пептиду MERS вказує на схожість щодо послідовності в геномі SARS-CoV-2. Ідентифікатор послідовності: QKJ68605.1. Кристалічна структура домену HR2 для SARS-CoV-2 наразі недоступна, тому вона представлена у вигляді прямокутника в (А) на основі останніх визначених координат, доступних у структурі 6VSB.

Встановлення структурної подібності між пептидом S1 MERS та геномом SARS-CoV-2, дозволило нам провести подальші дослідження. Нами було обрано пептид MERS, що виявляв спорідненість із SARS-CoV-2, послідовністю NH₂-CCTTTTTTSLTQINTTLLDLEYEMKKLEEVVKKLEESYIDLKEL-COOH, який іммобілізували на планшетах для імуноферментного аналізу та виявляли зв'язування із ним сироваток антитіл пацієнтів, що перехворіли на коронавірус. Ми зібрали сироватки пацієнтів, що перехворіли на SARS-CoV-2, які ніколи раніше не хворіли на інфекцію MERS-CoV. Ці зразки сироваток були протестовані на наявність антитіл (рис. 3.63).

Як видно з рис. 3.63 А, серед досліджуваних сироваток пацієнтів спостерігали сильніше зв'язування IgG конвалесцентних пацієнтів (що перенесли SARS-CoV-2), у порівнянні із зразками пацієнтів без попередньої інфекції SARS-CoV-2 ($p < 0,0001$, $n=87$). Незначні відмінності були виявлені для зв'язування імуноглобулінів IgM ($p=0,016$), а для підкласів антитіл IgA або IgE не виявлено різниці у зв'язуванні (рис. 3.64).

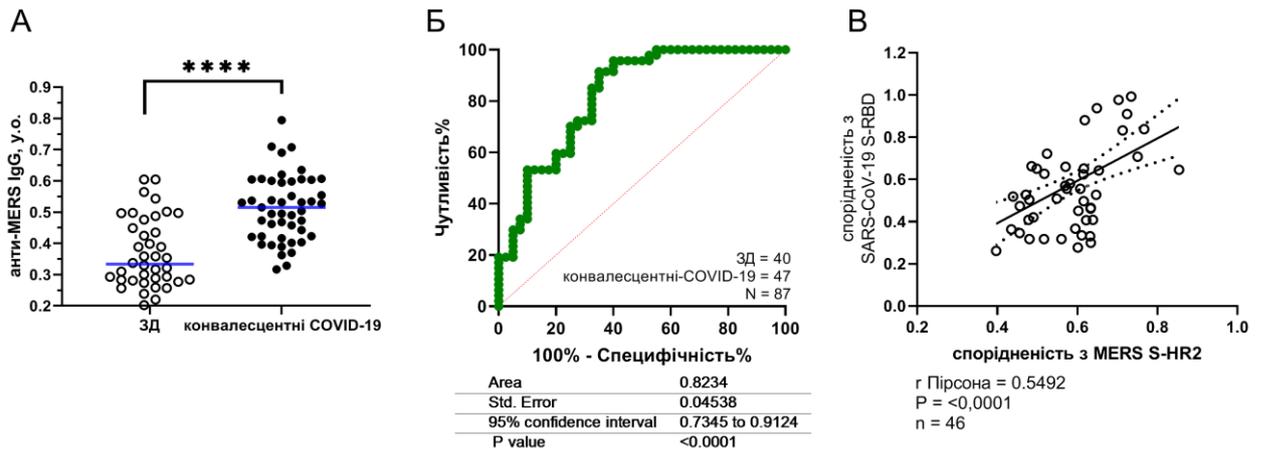


Рис. 3.63. Перехресна реактивність антитіл щодо коронавірусів: реконвалесцентні сироватки хворих на COVID-19 мають антитіла, що розпізнають MERS-специфічний пептид домену HR2 спайк білка. А – різниця між рівнями IgG, що розпізнають пептид домену HR2 у S білку MERS у реконвалесцентних пацієнтів з SARS-CoV-2 та неінфікованих здорових донорів. Б – крива ROC для дискримінації анти-коронавірусних антитіл IgG із використанням зазначеного MERS-пептиду як антигену. В – реактивність IgG у реконвалесцентній плазмі пацієнтів з SARS-CoV-2 щодо домену HR2 у S білку MERS проти частини RBD S білка SARS-CoV-2.

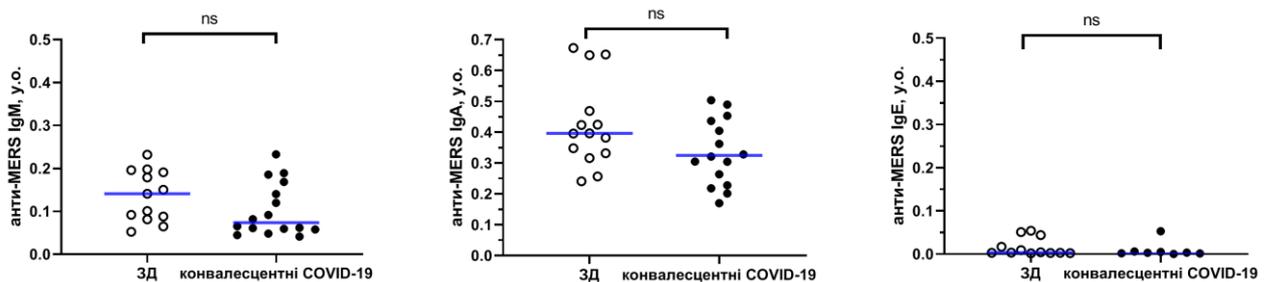


Рис. 3.64. Класи антитіл, що зв'язують пептид домену HR2 спайку білка вірусу MERS у реконвалесцентних сироватках COVID-19. Зліва направо: зв'язування імуноглобулінів IgM, IgA та IgE

Використання цього специфічного пептиду S1 MERS-CoV вказує, що дискримінація людей, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2, та тих, хто не

контактував з вірусом, дає значення достовірності прогнозування (площа під кривою ROC), рівне 0,823 (рис. 3.63, Б), зі специфічністю та чутливістю ~ 60 % (95 % достовірності). Інфекція SARS-CoV-2 індукує утворення антитіл із сильною перехресною реакцією щодо MERS-специфічного пептиду з 76 % гомологією. Висококонсервативні ділянки експонованого домену дозволяють припускати, що можливий і зворотній процес – коронавірусна хвороба, спричинена вірусами – збудниками застуди, може призвести до того, що деякі антитіла здатні розпізнавати епітопи SARS-CoV-2.

Щоб визначити, чи сильне зв'язування з пептидом S1 співвідноситься з більшою кількістю антитіл проти SARS-CoV-2, ми використали іммобілізацію рекомбінантного білка S1 домен RBD (Explogen, Львів, Україна) на імуноферментних планшетах для інкубації із зразками сироватки для оцінки кількості утворених антитіл типу IgG. Отримані результати представлені на рис. 3.63, В. Як видно з рисунку, зразки сироватки, які продемонстрували сильніше зв'язування антитіл IgG із S-білком MERS (домен HR2), також виявляли вищу реакційну здатність IgG щодо спайк-білка (домен RBD) SARS-CoV-2. Кореляція Пірсона між двома параметрами становила 0,5492, $p < 0,0001$. Це вказує на те, що посилення гуморальної реакції на один з вірусів пов'язане з інтенсифікацією імунної відповіді на інші коронавіруси.

Отже, ми не лише вперше в світі (22.08.2020 р. [226]) повідомили про існування перехресного гуморального імунітету до коронавірусів, а й визначили пептид, здатний активувати утворення антитіл в організмі людини до різних видів коронавірусів, і який є потенційно стійкий до їхніх мутантних штамів. Згодом результати були опубліковані в реферованому виданні [113].

3.2.2.2. Створення кон'югатів наночастинок із пан-коронавірусними антигенами. На основі закономірностей, встановлених у попередньому розділі, нами було виявлено функціональну, а саме гідроксильну групу, яка відповідала за ковалентну кон'югацію панкоронавірусного пептиду. Саме тому, нанодіаманти, що володіли здатністю активувати утворення НПП, було модифіковано за допомогою

точкових лазерних дефектів таким чином, що вони містили гідроксильну групу на поверхні (рис. 3.65, А). У пептид було введено додаткові амінокислоти, що виконували функцію лінкера та ділянки кон'югації (рис. 3.65, Б-2), а також замінено одну амінокислоту для кращої стеричної взаємодії. Результуючий пептид представлено на рис. 3.65, А, відмінності від коронавірусу виділені кольором. Таким чином даний пептид володів подібністю у 86 % до відповідної ділянки вірусу MERS-CoV (рис. 3.65, Б-1) та 74 % до ділянки вірусу SARS-CoV-2 (рис. 3.65, Б-3).

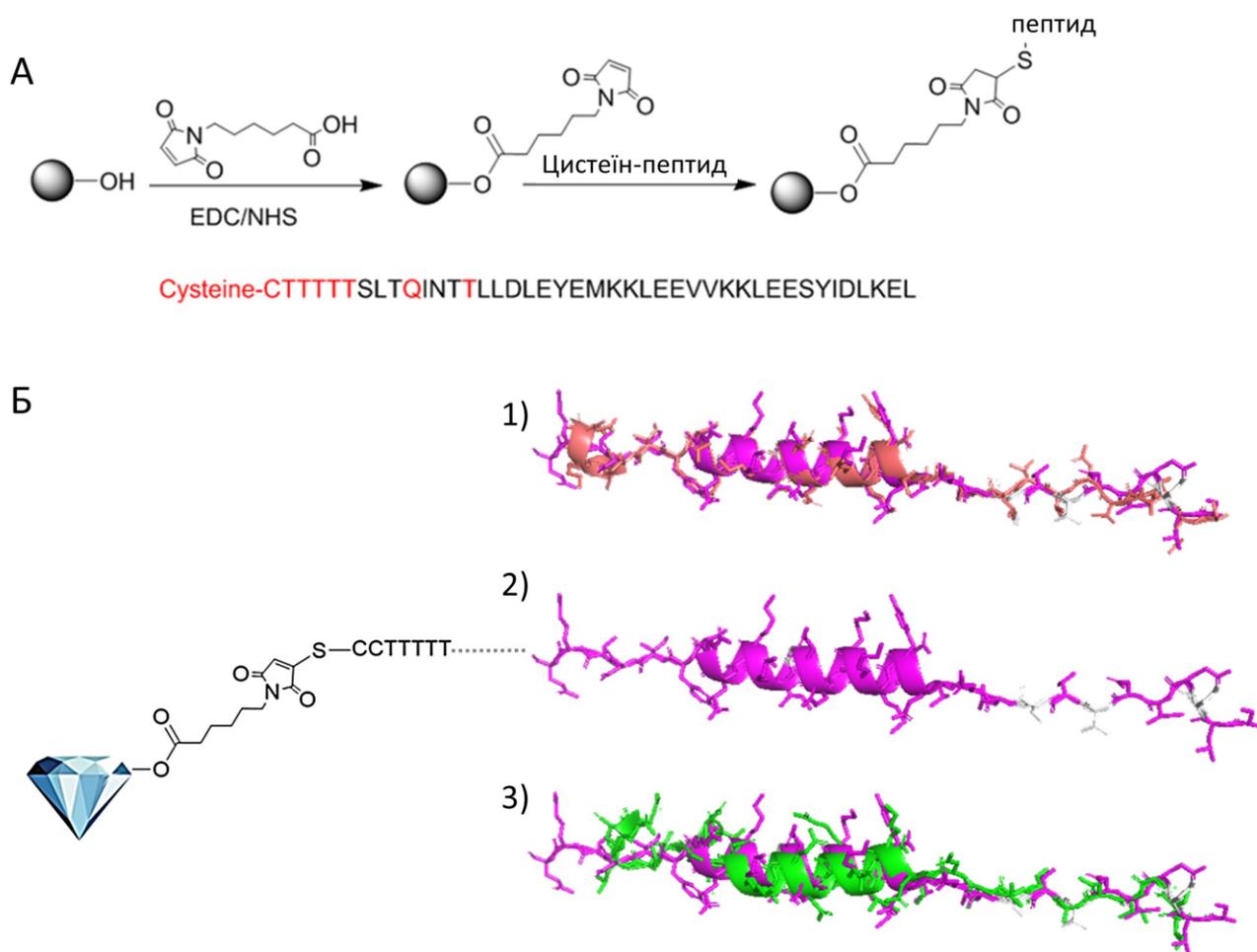


Рис. 3.65. Створений кон'югат нанодіамантів з пан-коронавірусним пептидом. А – схема кон'югації. Б – просторова схожість пептиду вірусу MERS (1), використаного панкоронавірусного пептиду (2), та пептиду вірусу SARS-CoV-2 (3).

3.2.2.3. Індукція утворення НПП за дії нанодіамантів. Створені нанодіаманти були використані для індукції утворення НПП. Останню перевіряли двома способами:

1 – нейтрофільні гранулоцити, виділені в градієнті густини із периферичної венозної крові людини, індукували у присутності барвника Sytox Green, що розпізнає екстерналізовану ДНК із клітинами без обробки, з нанодіамантами та з індукторами утворення НПП, такими як РМА та бікарбонат. Як нанодіаманти, так і індуктори формування НПП призводили до аналогічних змін у посиленні екстерналізації ДНК клітинами (рис. 3.66, А).

2 – у модель повітряної кишені миші на 5 день вводили 3 мг кон'югату НД з пептидом і через добу вміст повітряної кишені вимивали та аналізували мікроскопічно. Флуоресцентна мікроскопія виявляла екстерналізовану ДНК у вигляді волокон, яка поєднувалась із ядрами клітин із характерною для мишачих нейтрофілів формою (вказані стрілками, рис. 3.66, Б). Нанодіаманти виявляли за притаманною їм флуоресценцією в дальній червоній ділянці спектру.

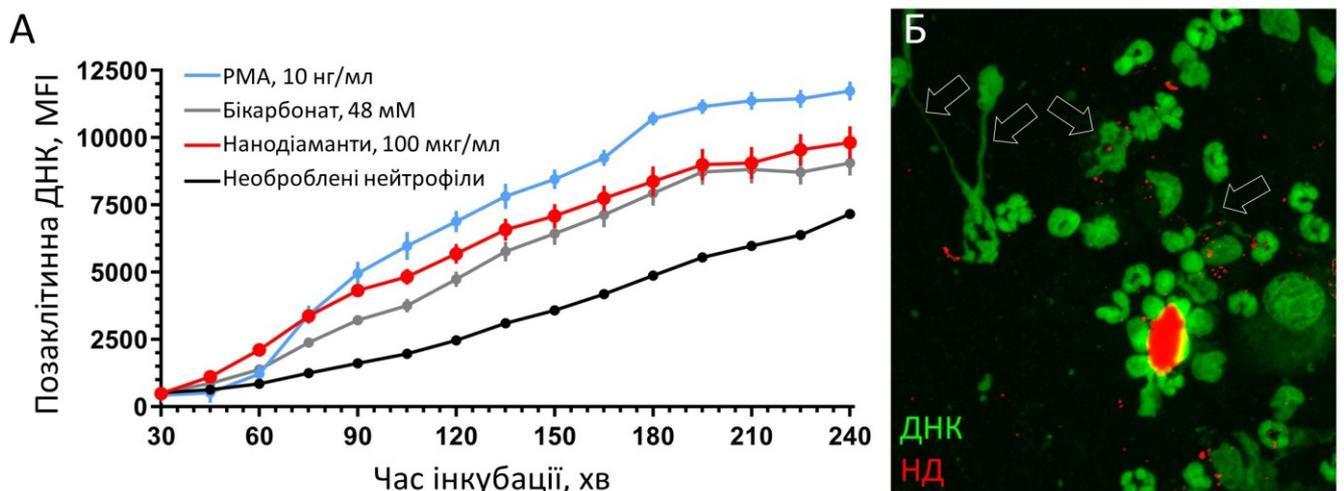


Рис. 3.66. Індуція НПП за дії створених нанодіамантів. А – екстерналізація ДНК в суспензії нейтрофільних гранулоцитів людини. Б – морфологічні ознаки формування НПП у повітряній кишені миші, фарбування SytoxGreen, об'єктив 40x 0,95NA

3.2.2.4. Імунна відповідь на створенню імуногенну суміш. Гуморальну та клітинну імунні відповіді на створену імуногенну суміш – панкоронавірусний пептид, кон'югований з нанодіамантами, визначали за допомогою моделі імунізації мишей Balb/c. Антитіла проти панкоронавірусного пептиду як типу IgG, так і IgM визначали перед імунізацією (0 день), а також після 14 і 32 днів імунізації

(рис. 3.67). Після другої вакцинації ND-панкоронавірусним пептидом спостерігали сильну гуморальну імунну відповідь. Вимірний титр антитіл становив 1/4 000; порогове значення було встановлено на 2,5-кратне значення титру антитіл тварин, імунізованих OVA (рис. 3.67). Наноструктури викликали лише незначне збільшення антитіл гострої фази типу IgM через 28 днів, що ми вважаємо сприятливим фактором, оскільки надмірне утворення IgM може сприяти утворенню імунних комплексів і подальшому пошкодженню нирок [227, 228].

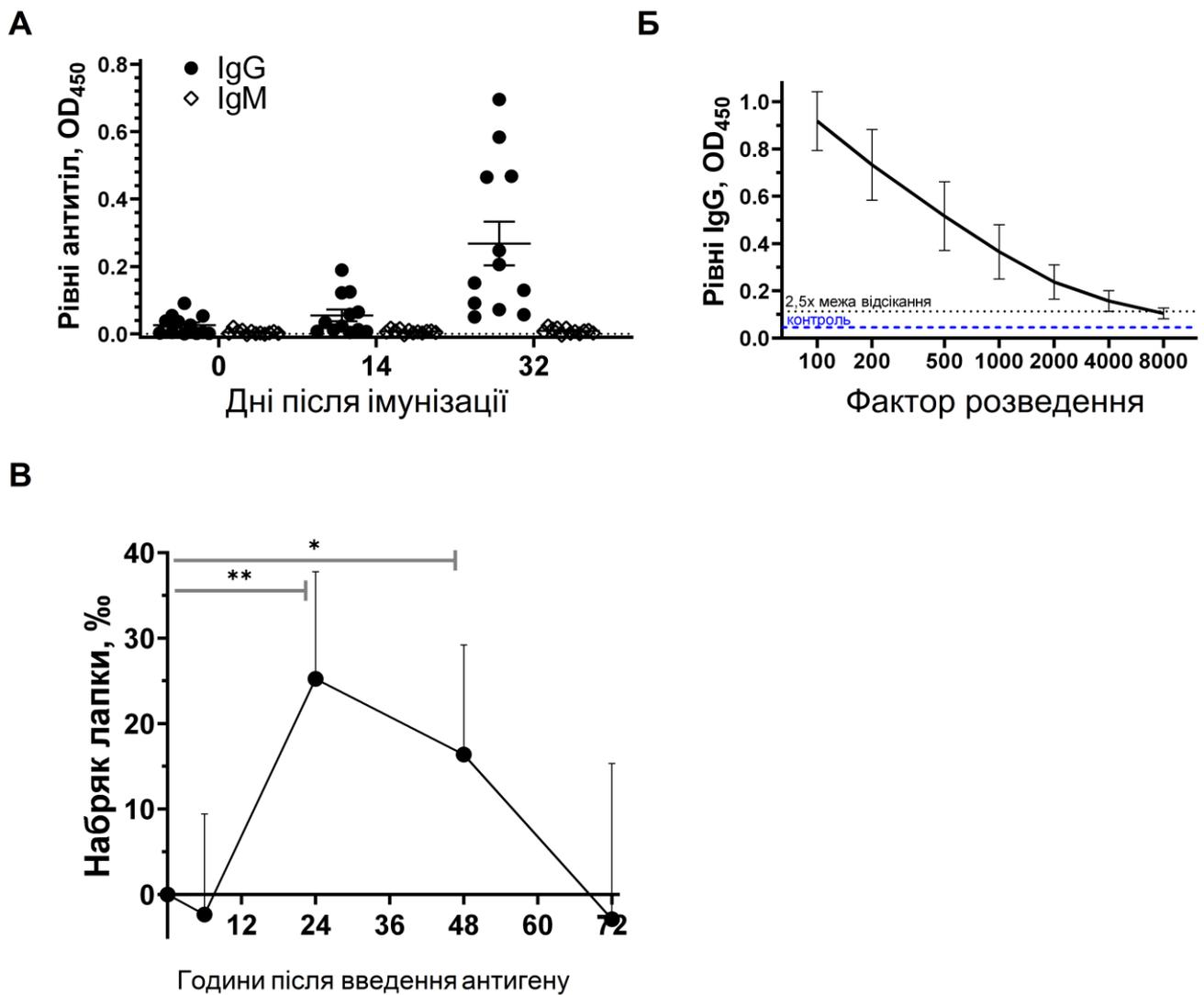


Рис. 3.67. Імунна (клітинна та гуморальна) відповідь у мишей. А – гуморальна імунна відповідь, представлена рівнями антитіл проти панкоронавірусу IgG та IgM протягом курсу імунізації (здійснено на 0 день та 15 день), Б – титри антитіл IgG, проти панкоронавірусного пептиду, В – клітинна імунна відповідь, представлена реакцією гіперчутливості сповільненого типу, вимірюною за набряком подушечки стопи після ін'єкції антигену

Реакцію гіперчутливості уповільненого типу (DTH) [4] використовували для оцінки клітинної імунної відповіді за допомогою встановленої неінвазивної моделі [4]. У досліджуваних умовах спостерігали значну імунну відповідь у тесті DTH, яка досягала максимуму через 24 години.

Отже, отримані дані свідчать, що кон'югат нанодіамантів з панкоронавірусним пептидом викликав і гуморальну, і клітинну імунну відповідь у лабораторних мишей. Отримані дані опубліковано в роботі [229].

3.2.2.5. Довготривалі ефекти імунізації наночастинками, що індукують утворення НПП. Після успішної демонстрації стійкої імунної відповіді на рекомбінантні антигени SARS-CoV-2 за використання НЧ як ад'ювантів ми здійснювали періодичні забори крові лабораторних тварин, щоб оцінити титр антитіл класу IgG при імунізації нанодіамантами (НД) та комбінацією повного (CFA, день 1) та неповного (IFA, день 14) ад'ювантів Фройнда (моделльний ад'ювант у ветеринарії, проте заборонений до використання у людини). Проведений ІФА аналіз показав утворення стійкого титру антитіл з максимумом через 90 днів після імунізації нанодіамантами, поєднаними з пептидом коронавірусу та його збереження до 240 дня. За імунізації CFA/IFA на 240 день титр антитіл знижувався до 50 % від максимуму (рис. 3.68).

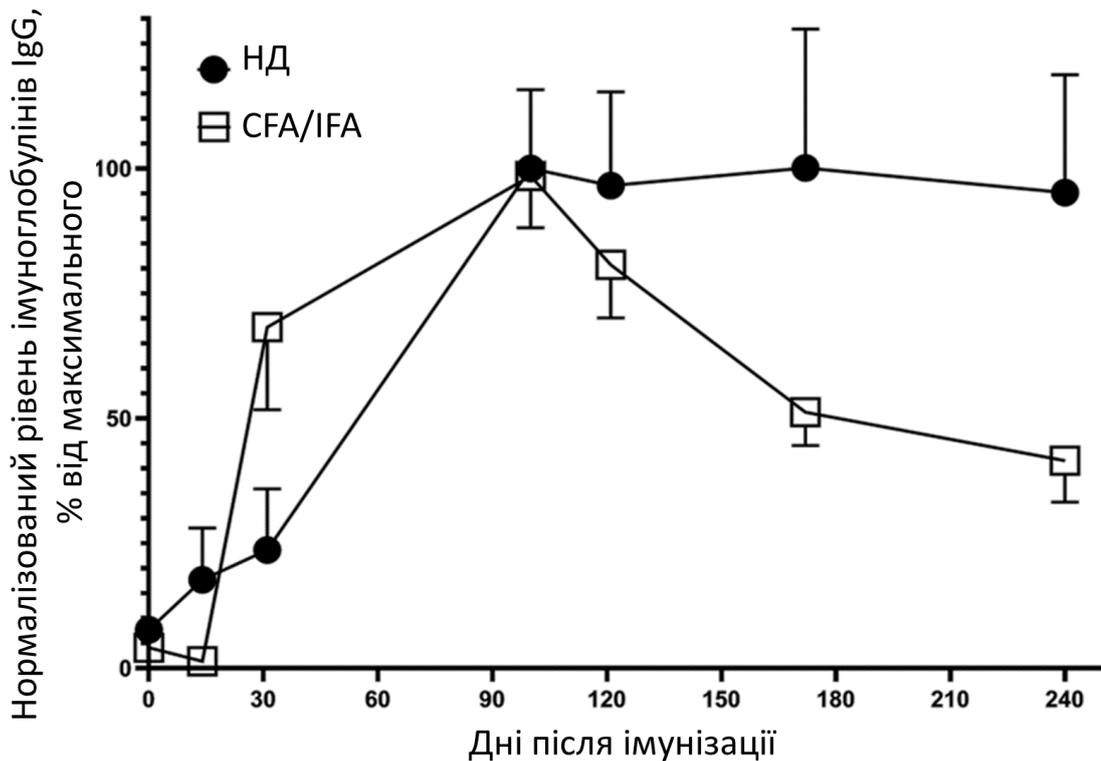


Рис. 3.68. Гуморальна імунна відповідь до білка SARS-CoV-2 у лабораторних мишей лінії Balb/c. Оцінка вмісту імуноглобулінів класів IgG IgM методом ІФА протягом 240 днів. Дані нормалізовано за максимальним значенням титру

Введення інертних нанодіамантів в організм завжди викликає питання біосумісності. Ми дослідили короткотривалі та довготривалі ефекти введення НД в організм мишей. Для контролю розподілу нанодіамантів в організмі, мишам вводили внутрішньочеревно 1 мг нанодіамантів, мічених флуоресцентним барвником CF790 (ND-CF790). Моніторинг флуоресцентної сполуки в тілі проводили флуоресцентним сканером In-Vivo Xtreme (Bruker). Ми виявили сильний флуоресцентний сигнал (збудження 760 нм, випромінювання 830 нм) за 5 годин у місці введення. Інтенсивність сигналу поступово зменшувалася і зникла через 168 годин (рис. 3.69). Нанодіаманти були захоплені в НПП (як показано для моделі повітряної кишені) і були локалізовані на місці введення в гранульомоподібні структури. Ми не спостерігали жодного перенесення флуоресцентного сигналу в кров, сечу чи жовч, натомість барвник поступово окиснювався у місці введення та втрачав флуоресценцію.

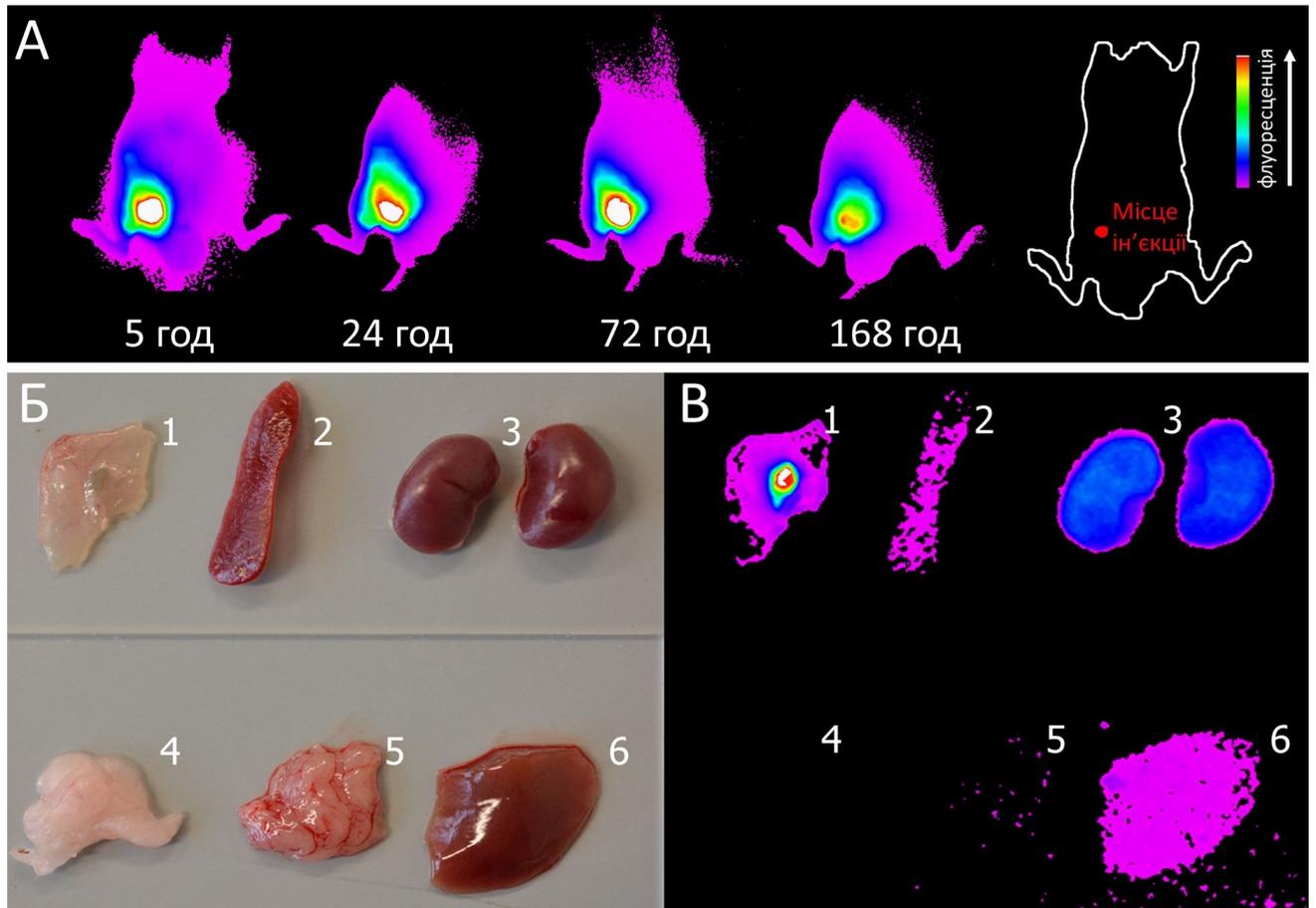


Рис. 3.69. Розподіл суспензії нанодіамантів, мічених барвником CF790 в організмі мишей через 5, 24, 72 та 168 год після внутрішньочеревної ін'єкції (А) та в органах тварини (Б, В). Зображення флуоресценції (А, В) були отримані при збудженні 760 нм та випромінюванні 830 нм. Типове зображення 1 з 3-х мишей, що аналізувалися. 1 – місце ін'єкції, в якому формується гранульома, 2 – селезінка, 3 – нирки, 4, 5 – жирова тканина очеревини поблищу ділянки ін'єкції, 6 – печінка.

Також нами здійснено гістологічний аналіз тканин гранульом, утворених навколо ділянок введення нанодіамантів в організм та майже через рік після їх підшкірного введення в організм миші. На підставі аналізу аутофлуоресценції нанодіамантів [230], ми підтвердили наявність саме нанодіамантів в ділянках введення (рис. 3.70). Усі нанодіаманти були згруповані у гранульомно подібні структури, які були оточені фібробластами, волокнами сполучної тканини та не виявляли ознак дисемінації в тканинах.

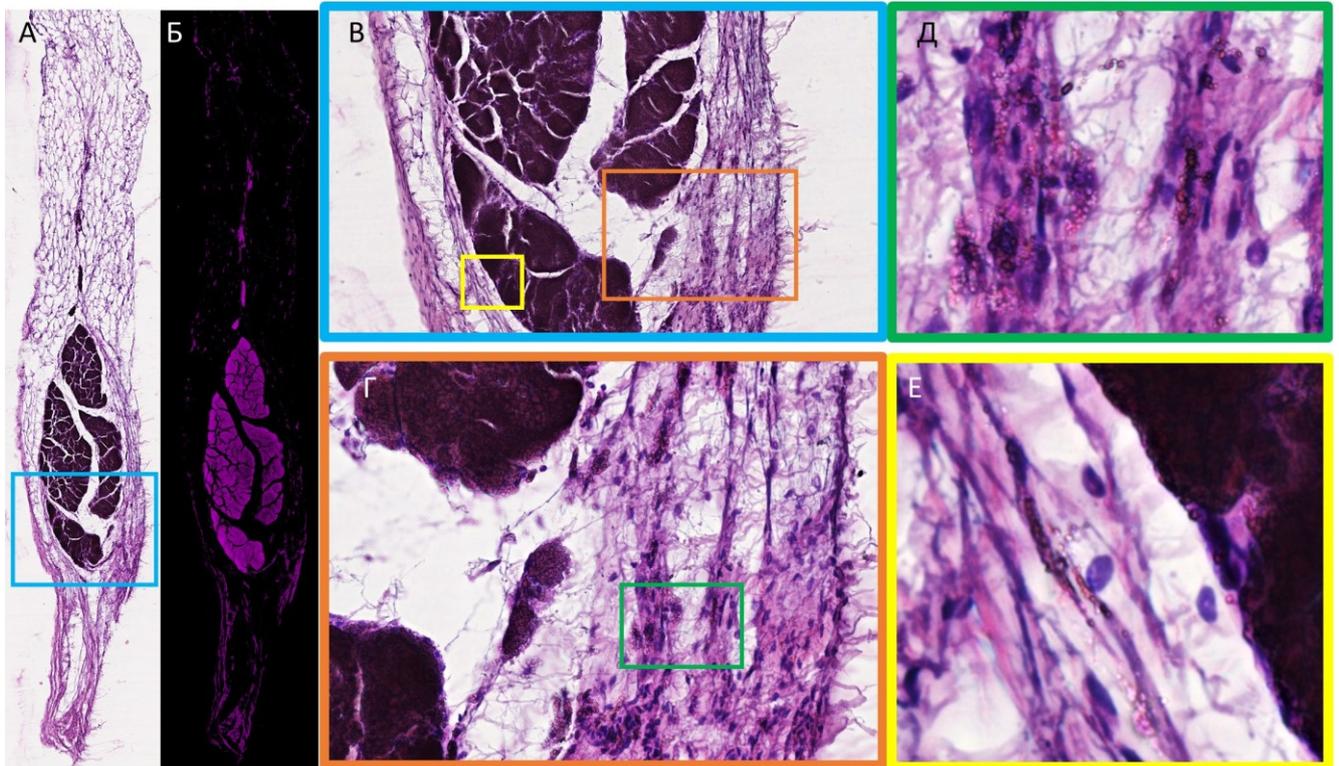


Рис. 3.70. Гранульоми, утворені навколо ділянок відкладу введених нанодіамантів. А – панорамне зображення. Б – це ж зображення в режимі флуоресценції при 820 нм. В-Е – окремі елементи панорамного зображення, що демонструють накопичення груп нанодіамантів в окремих клітинах, та утворення ділянки осумковування із грануляційної тканини навколо центрального депозиту НЧ. Фарбування Н&Е, об'єktiv 40x 0,95NA

Важливим питанням є тривалість імунної відповіді при використанні відносно слабого антигену – синтетичного пептиду та сильного ад'юванту. Щоб перевірити тривалість імунної відповіді до панкоронавірусного пептиду-наноад'юванту ми здійснили імунізацію кролів, використовуючи введення антигену 4 рази (1, 15, 45 та 60 день). Як контроль, здійснили імунізацію імуноглобуліном людини (IVIg, 150 кДа, з використанням як ад'юванту повного та неповного ад'ювантів Фройнда – сильного ад'юванта, забороненого до використання в людини) [231]. В результаті ми спостерігали сильну імунну відповідь у лабораторних кролів упродовж 120 днів після імунізації, в той час як імунна відповідь, індукована традиційними ад'ювантами, – компонентами вакцин, швидко спадала. Враховуючи, що лабораторний кірль живе кілька років, при

перенесенні отриманих даних на людину є всі підстави очікувати, що вакцини зможуть забезпечити кількарічний захист від вірусу (рис. 3.71). На відміну від ад'юванта Фройнда введені наноконкомпозити не викликали нагноєння в ділянці ін'єкції, як це видно на рис. 3.71.

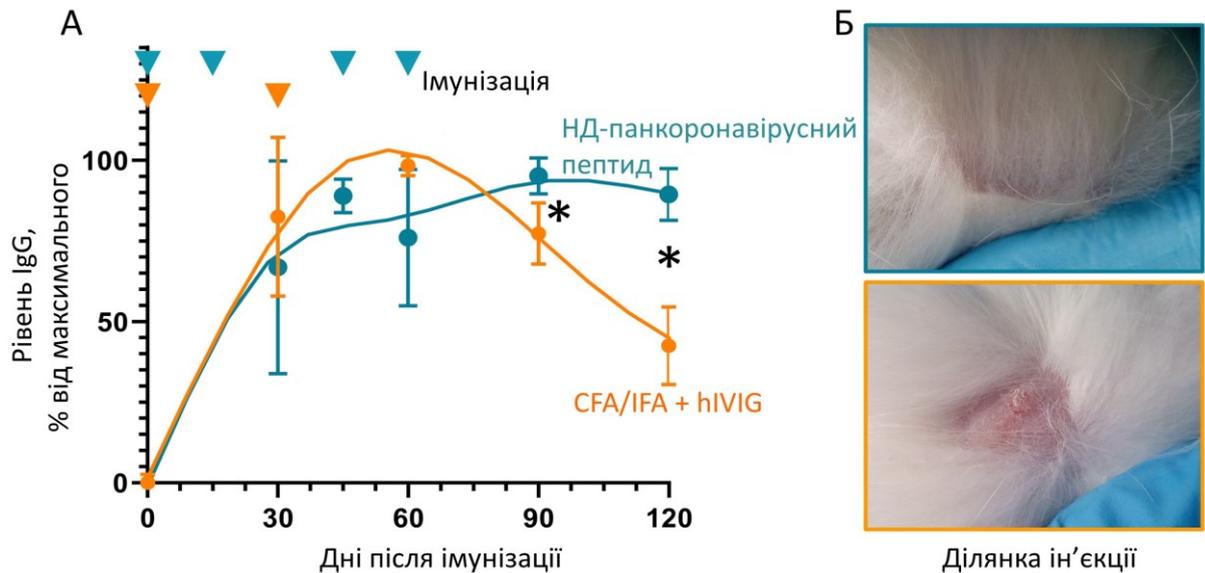


Рис. 3.71. Імунна відповідь у формі вироблення антитіл типу IgG, проти антигенів вірусу MERS при використанні традиційних ад'ювантів та сильних нанoad'ювантів. * – позначає достовірну різницю у кількості утворених антитіл на зазначені дні тестування. Вставка демонструє ділянку ін'єкції з використанням зазначених ад'ювантів

Отже, використання НЧ, що стимулюють утворення НПП дозволяє індукувати стійку імунну відповідь до чужорідних антигенів, що вводяться разом з НЧ. При цьому утворення НПП забезпечує секвестрування НЧ та запобігає побічним ефектам інших поширених ад'ювантів, таких як нагноєння ділянки ін'єкції. Утворена імунна реакція залишається стійкою протягом тривалого часу.

Отож, отримані нами результати дослідження процесу активації нейтрофільних гранулоцитів, що провокують хронічний запальний процес при надмірному надходженні в організм індукторів ендогенних НЧ (розділ 3.1), мають корисне практичне застосування, яке було використано з метою утворення контрольованого запалення та супутньої імунної відповіді (розділ 3.2).

Отримані дані підсумовано в роботах [196, 197, 232–234] та розділі монографії [195].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1. Роль ендогенних наночастинок в активації нейтрофільних гранулоцитів

Відомим є той факт, що віруси, бактерії, гриби та інші патогени індукують НПП [136]. НПП здійснюють функції із ізолювання окремих біологічних об'єктів, таких як окремі стафілококи та ділянки нерозу [5]. Проте є й інший шлях активації нейтрофільних гранулоцитів, який не пов'язаний із біологічними рецепторами, натомість спричиняється гідрофобними взаємодіями наноконструкцій із плазматичною мембраною. Описано, що НПП здатні ізолювати екзогенний матеріал на зразок нанодіамантів [4], полістирену [4], азбесту [13], моноурату натрію [25], оксалату натрію [13]. В деяких випадках взаємодія з такими частинками індукує вивільнення ендогенних протеаз, що специфічно розщеплюють прозапальні цитокіни, сприяючи зменшенню запалення, як це показано для кристалів моноурату натрію при подагрі [25, 235]. При цьому кристали залишаються оточеними НПП, які потім пасивуються в тканинах, формуючи подагричні тофуси.

Пасивація великих/чужорідних/токсичних предметів корисна для організму, але водночас вона створює ще один виклик для імунної системи. Коли НПП вивільняються на відносно невеликих ділянках, вони легко видаляються/очищаються системою макрофагів, утворюючи точний баланс між утворенням НПП та їх тихим очищенням фагоцитарною системою. Якщо процес очищення буде порушений або через надмірне утворення НПП, або через збій макрофагальної системи, організм зіткнеться з величезною кількістю окиснених АФК, отриманих з НПП, тобто імунологічно «новими» епітопами [7]. Формування НПП є реакцією нейтрофілів на ушкоджуючий тригер, коли усунути його фагоцитозом не вдається. За нормальних умов видаленням НПП із знищеними патогенами займається фагоцитарна система організму, але при намірному утворенні НПП існує висока ймовірність неналежного їх очищення цією системою.

Щодо механізму утворення НПП найцікавіші дані черпаємо з роботи [4], де описана дія нанодіамантів та полістирену на нейтрофільні гранулоцити. Оскільки рецептори до вуглецю та його алотропних модифікацій нам не відомі і мало ймовірно, що вони здатні існувати, зважаючи на те, що вуглець є основним елементом органічних сполук, то основну роль у розпізнаванні згаданих частинок відіграють саме поверхневі взаємодії із гідрофобними НЧ, а також розмір самої частинки.

Сама плазматична мембрана має товщину від 6 до 9 нм. Оскільки ліпіди плазматичної мембрани є гідрофобними, вони будуть поглинатися поверхнею НЧ. Отже, НЧ розміром менше товщини плазматичної мембрани (наприклад, 3 нм) буде вбудована між її бішарами (рис. 4.1, А), НЧ набагато більшого розміру (наприклад, 50 нм) буде взаємодіяти з бішаром, створюючи кривизну навколо НЧ (рис. 4.1, В), але НЧ з розміром, співмірним з розміром плазматичної мембрани, спричинять викривлення біліпідного шару з точками стеричних конфліктів, або простіше кажучи, «дірок» у плазматичній мембрані (рис. 4.1, Б, показано стрілками). Це приблизне моделювання за допомогою молекулярних моделей було підтверджено і більш точними математичними розрахунками [55].

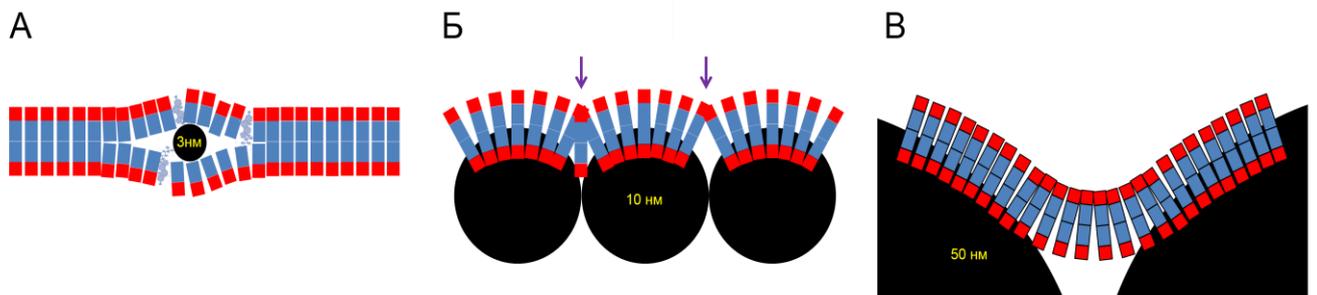


Рис. 4.1. Взаємодія гідрофобних наночастинок (чорні) зазначеного розміру з плазматичною мембраною клітини. А – 3 нм; Б – 10 нм; В – 50 нм. Модифіковано з роботи [195]

Клітина неминуче відчує отвір, або витік у плазматичній мембрані і негайно запусить механізм ремонту ураженої ділянки, який здійснюється шляхом ізоляції ураженої частини плазматичної мембрани та поглинання її в ендосому [236]. Пізніше ця ендосома буде об'єднана з лізосомою з утворенням вторинної лізосоми

та перероблена, витік буде замінено непошкодженим подвійним шаром. Але якщо гідрофобна НЧ все ще знаходиться в ліпідному подвійному шарі, витік не буде ліквідований. У цьому випадку мембранний дефект буде локалізований у мембрані вторинної лізосоми (рис. 4.2) і лізосомальний вміст буде вивільнено в цитоплазму. Схема взаємодії гідрофобних НЧ з поверхнею клітини наведена на рис. 4.2.

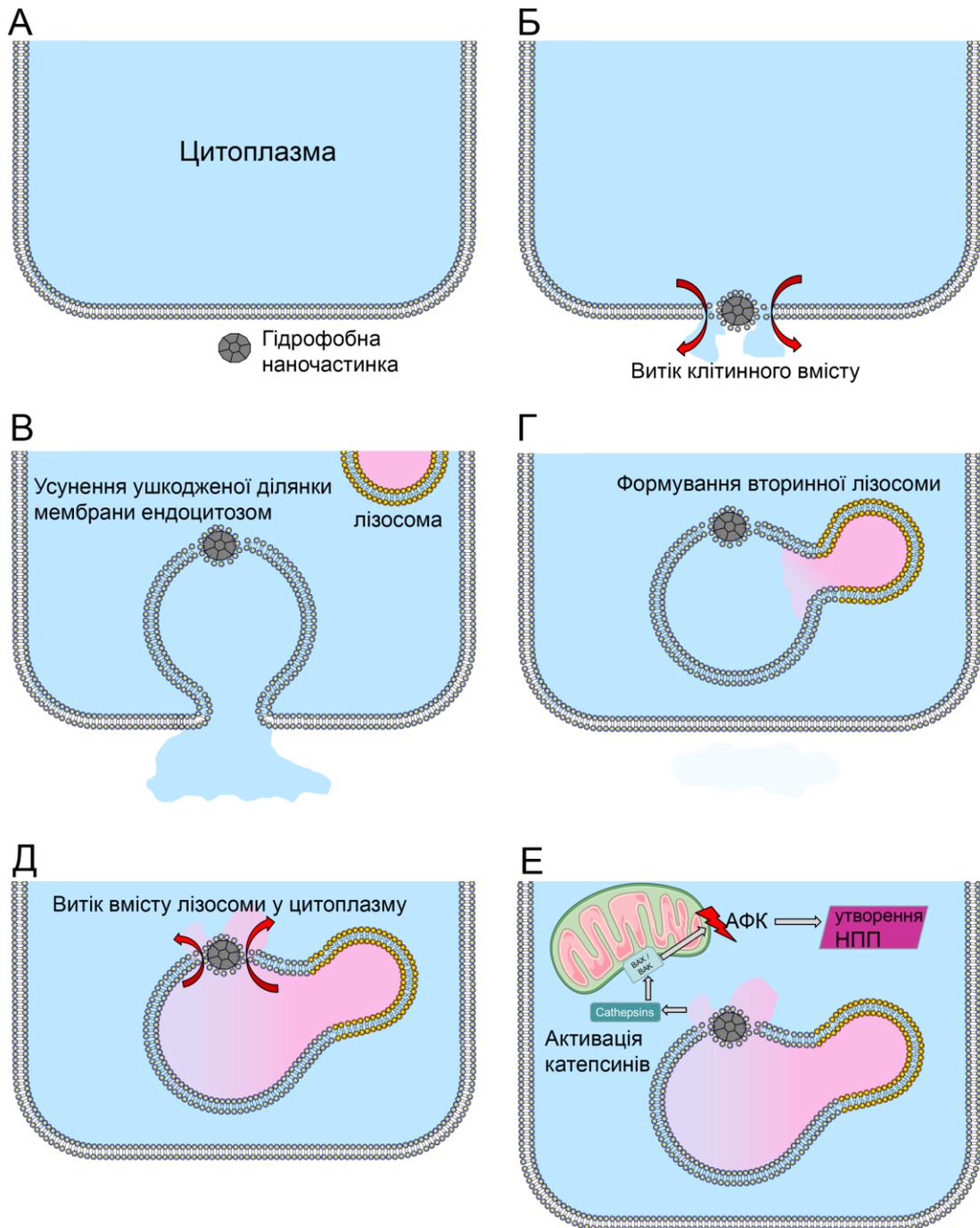


Рис. 4.2. Взаємодія гідрофобних наночастинок з поверхнею клітини, яка веде до uszkodження клітини та формування НПП нейтрофільними гранулоцитами. А - Е – послідовність подій. За даними [4, 57, 195]

За оцінками авторів [4] найбільш шкідливий розмір гідрофобних НЧ знаходиться в діапазоні від 10 до 40 нм. На практиці вплив на клітини НЧ з гострими, виступаючими, голчастими формами призведе до пошкодження мембрани та спричинить клітинну смерть. Наприклад, моноурат натрію, азбест і оксалат кальцію можуть викликати загибель клітин [13].

Водночас у роботі [57] Mulaу et al. продемонстрували, що при гострому запаленні нирок відбувається кристало-індукований некроптоз за участі процесів зміни проникності мітохондрій. Після того, як вторинна лізосома просочує катепсину в цитоплазму, клітина виробляє АФК. Це призводить до пошкодження мітохондрій, спостерігається їх набряк, втрата потенціалу зовнішньої мембрани мітохондрій, втрата крист. Ймовірно це пов'язано з утворенням перехідних пор проникності МРТР (mitochondria permeability transition pore), які надалі індукують ще більшу продукцію АФК. Крім того, було ідентифіковано ще один важливий білок у некроптозі, викликаному кристалами. Важливу роль в утворенні МРТР відіграє пептидилпролілізомераза F (PPIF). Інгибування PPIF може зменшити утворення МРТР, що зменшує деякі ефекти, спричинені кристалами, зокрема втрату мембранного потенціалу [57]. Цей процес захищає мітохондрії від подальшого пошкодження і продукування більшої кількості АФК, які в іншому випадку призвели б до клітинної смерті.

Ми вважаємо, що обидва процеси мають місце в активації утворення НПП за дії екзогенних частинок. Утворення АФК є типовим тригером для нейтрофілів до утворення НПП, для інших клітин процес формування НПП є непритаманним (є окремі повідомлення про утворення макрофагальних позаклітинних пасток, еозинофільних позаклітинних пасток, проте їх існування є дискутабельним [136]).

Щоб перевірити чи процес взаємодії НЧ призведе до однакових процесів загибелі у різних типів клітин, ми проінкубували нейтрофільні гранулоцити людини та клітини раку шийки матки лінії HeLa з однаковою кількістю нанодіамантів розміром 10 нм. В обох типів клітин ми спостерігали утворення мікро- та макровакуоль протягом перших кількох хвилин після взаємодії (рис. 4.3). Проте надалі клітини HeLa виявляли ознаки некрозу, а нейтрофільні гранулоцити

продукували НПП. Описана інкубація нанодіамантів з еритроцитами людини в аналогічних умовах призводила до вивільнення гемоглобіну в середовище [4].

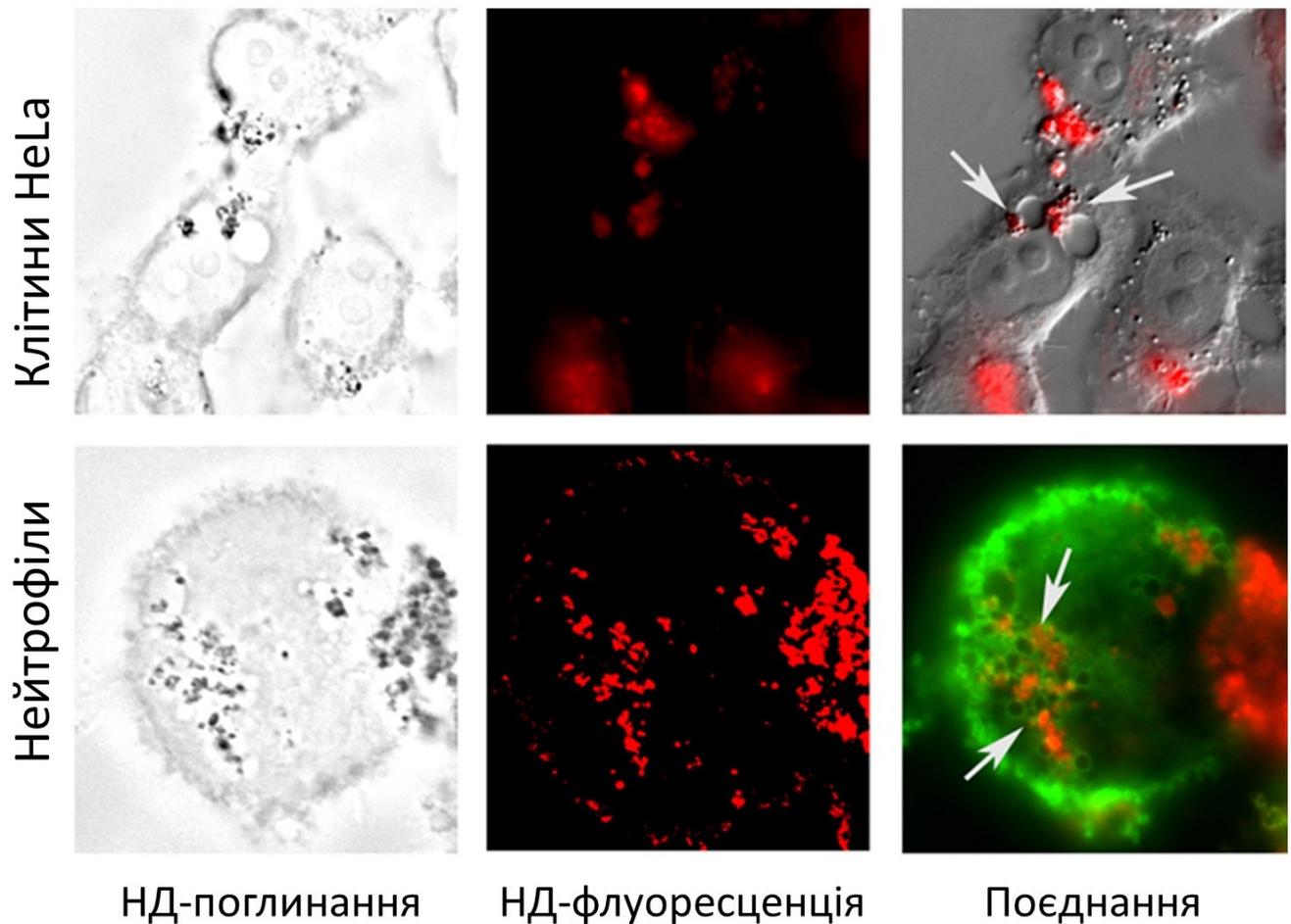


Рис. 4.3. Утворення мікро- та макровакуоль у нейтрофільних гранулоцитах та клітинах HeLa при контакті з нанодіамантами розміром 10 нм. Останні візуалізували за поглинанням світла при 600нм та флуоресценцією при збудженні 630нм та емісії 680нм. Мембрани нейтрофілів додатково фарбували ліпофільним мембранним барвником. Об'єктив 100x 1,45NA

Отримані нами результати дозволили висунути гіпотезу про те, що взаємодія НЧ з клітинами включає початкові етапи гідрофобних взаємодій, які, порушуючи цитоархітектоніку в клітинах нейтрофільних гранулоцитів, спричиняють формування НПП, в інших клітинах така взаємодія призводить до некрозу. Про що було опубліковано нами в роботі [195].

Вивільнені НПП і часточковий компонент будуть притягувати нейтрофіли до місця контакту НЧ доти, доки їх концентрація не буде достатньою для формування

агрегованих НПП, останні утворюють щит/оболонку або огортатимуть НЧ та початково пошкоджені клітини, викликаючи локальне запалення. Як було показано в роботі [25], утворення агрегованих НПП супроводжуватиметься вивільненням протеаз, що розщеплюють цитокіни, а також, як показано нами – ферментів, що розкладають циркулюючі імунні комплекси [115], завдяки чому запалення самообмежується. Дійсно, навіть стерильні НЧ викликають самообмежене запалення, як було показано в [26]. Утворена структура, схожа на гранульому, буде секвеструвати наноматеріал і зупинити його поширення та шкідливу дію в організмі, як показано в розділі 3, (рис. 4.4).

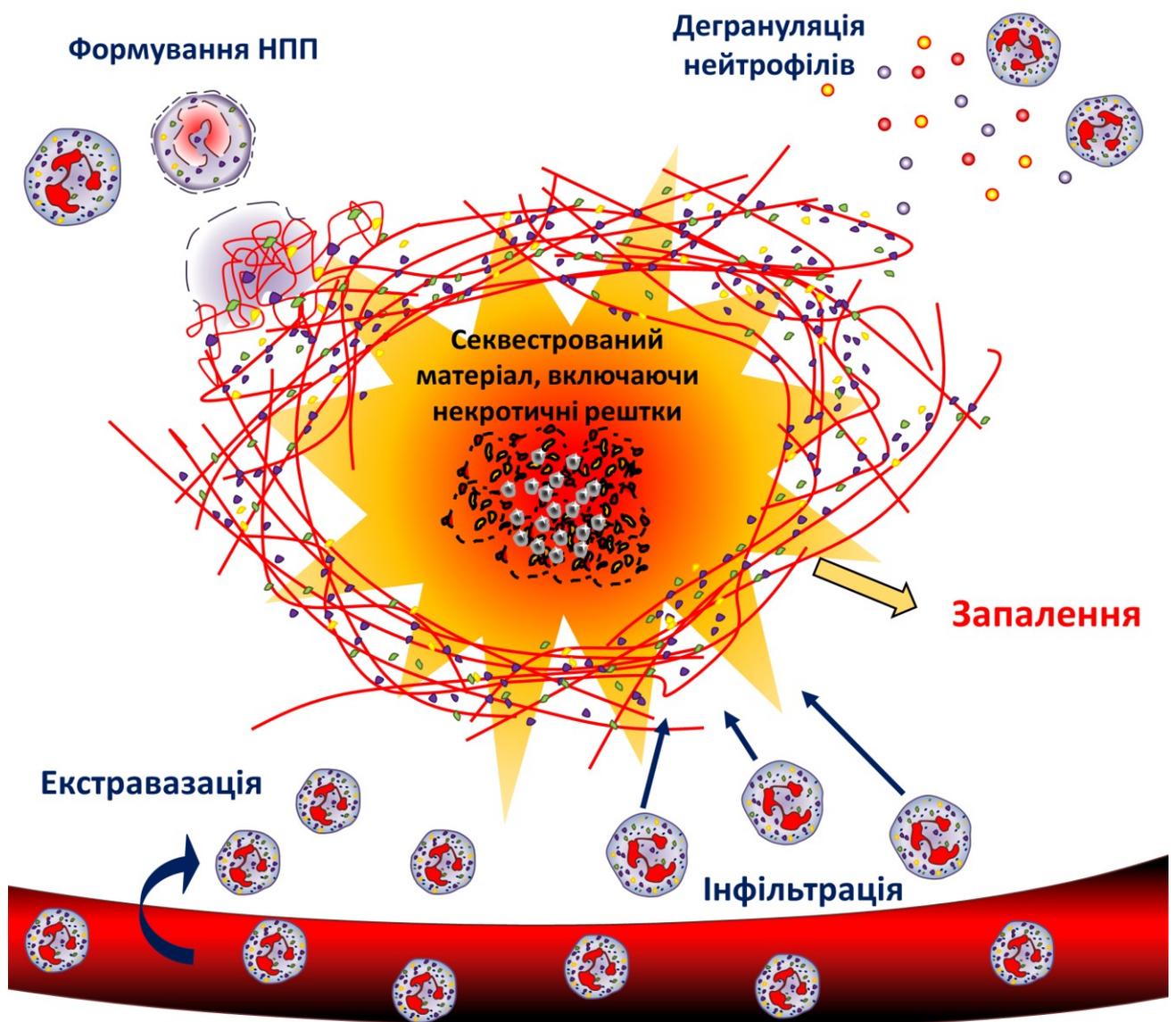


Рис. 4.4. Секвестрація наночастинок за допомогою НПП під час стерильного самообмежувального запалення. На підставі даних [26]

4.2. Ушкодження гепатобіліарної системи нейтрофільними позаклітинними пастками та шляхи його усунення

Серед описаних вище природних кристалів, що індукують НПП, із гепатобіліарною системою пов'язані нанокристали холестерину та моноурату натрію (MSU).

Холестерин. Кристали холестерину є першими рідкими кристалами, які були виявлені у Львівському університеті понад 150 років тому [237]. Вони є поширеними кристалами в організмі людини, здатні спонтанно і цілком природно виникати в жовчному міхурі та його просвіті [12]. Нейтрофіли також надзвичайно поширені в організмі та патрулюють його в пошуках ознак патогенності, причому жовчна протока є однією з гарячих областей, оскільки вона з'єднує життєво важливий орган – печінку з кишечником, повним бактерій (у деяких тварин немає жовчної протоки і вони випускають жовч безпосередньо в кишечник). Гідрофобні кристали холестерину можуть спричинити загибель клітин [13], що створює ідеальну комбінацію проблем. Кристали холестерину в просвіті жовчного міхура можуть викликати формування НПП і, як наслідок, призвести до оклюзії його просвіту [11]. До того ж, що це автокаталітичний процес – чим більше утворюється НПП, тим більшим стає камінь, оскільки агреговані НПП просочуються кальцієм та іншими солями в гіпернасиченій жовчі.

В цій роботі ми вперше безпосередньо демонструємо, як НПП захоплюють кристали холестерину в моделі літогенного раціону тварин. ДНК із НПП обплітає нанокристали холестерину [137], вона служить з'єднуючим матеріалом (сильно заряджена) і, як було показано, присутня у великих кількостях на поверхні жовчних каменів.

Моноурат натрію. Сечова кислота є одним із основних побічних продуктів людського катаболізму, а також хорошим антиоксидантним побічним продуктом метаболізму. Нормальний діапазон концентрації сечової кислоти (або гідроуратного іона) у крові людини становить від 25 до 80 мг/л для чоловіків і від 15 до 60 мг/л для жінок, водночас навіть зареєстровані показники в 96 мг/л не

викликають подагру [238]; розчинність сечової кислоти становить 60 мг/л при 20°C. Концентрація сечової кислоти в клітинах може бути навіть вищою, але в міжклітинному середовищі мало натрію. Але коли сечова кислота зв'язує натрій, утворюється MSU з набагато нижчою розчинністю, який має тенденцію випадати в осад у вигляді голчастих кристалів [76], ініціюючи подагру. Дія MSU опосередковується поглинанням кристалів MSU моноцитами та подальшим утворенням інфламасоми NALP3 з наступним вивільненням IL-1 β [239]. Утворення IL-1 β є сигналом запалення, він активує нейтрофіли разом з іншими імунними клітинами. Крім того, нейтрофіли безпосередньо поглинають кристали MSU, ініціюючи залежний від інфламасом шлях утворення НПП [240, 241], в підсумку огортають кристали MSU агрегованими НПП і провокують реакцію самообмеження запалення, що призводить до зникнення нападу подагри (якщо нейтрофіли функціонують і генерують достатньо АФК) [25].

Утворення НПП у гепатобіліарній системі, зокрема печінці, може призводити до системних змін. В ході проведених досліджень ми спостерігали зміни багатьох систем організму за умов ВЛВХД та ВФД. При переході на ВЛВХД та ВФД тварини у перші дні втрачали апетит, у них зменшувалась маса тіла, проте після 2 – 3 днів голодування вони починали поступово звикати до корму ВЛВХД чи споживати надмірну кількість води з фруктозою (ВФД) і це супроводжувалось значним зростанням апетиту/спраги. Уже на 6 день експерименту маса тіла дослідної групи була статистично вищою ніж у контрольної. На 2–3 тиждень експерименту починались поведінкові зміни, що виражались в апатії, зменшенні рухливості, відсутності відповіді на загрозливий чинник. На 22 день зміна маси досягала 25 % і залишалась такою до кінця спостереження (іде мова про середні значення, адже одна тварина почала прогресивно втрачати вагу). Разом з тим, в іншому експерименті ми спостерігали смертність і повне руйнування печінки на 8 тиждень ВЛВХД. Аналіз сечі на 28 день показав зростання вмісту білка в сечі, що є відомою ознакою ушкодження ниркових капсул [242]. Водночас на 28 день ми спостерігали утворення каменів у жовчних міхурах (50 % тварин), жирову дистрофію печінки, притаманну НАСГ (100 % тварин), що супроводжувалась

гіпертрофією гепатоцитів, заповненням їх жиром та некрозом. Ознаки цирозу печінки починали виявлятися на 4 тиждень ВЛВХД і були сильно виражені на 6 тиждень ВЛВХД. У цей же час виявлялись ознаки запалення, пов'язані із появою імунних комплексів. На 6 тиждень нами також було виявлено зростання рівня еластази нейтрофілів. Слід також зазначити, що під час експерименту тварини утримувались в стерильних умовах віварію, а це захищало їх від природних інфекцій (адже усунення нейтрофілів з організму значно зменшує опірність організму патогенним чинникам [161]).

Ушкодження епітелію жовчних шляхів, ушкодження нирок та зміна поведінки (яка не є лише відповіддю на ожиріння) свідчить про те, що ВЛВХД та ВФД має системний вплив, що пов'язаний із виділенням ушкоджуючих факторів у кров (якщо аналізувати ушкодження нирок). Водночас руйнування нейтрофільних гранулоцитів у тварин за допомогою специфічних антитіл хоч і не зменшувало набір маси тіла (метаболічні ознаки), але значно зменшувало ушкодження тканин печінки та формування жовчних міхурів. Це підтверджено виявленими нами нейтрофільними гранулоцитами та НПП на поверхні жовчних каменів і добре узгоджується з літературними даними.

Нами встановлено, що активність еластази нейтрофілів зростає не лише в ушкодженому раціоном органі – печінці, – а і в селезінці. Це зумовлено поверненням туди активованих нейтрофільних гранулоцитів та спричиненою системною імунною відповіддю. Використання прямих флуоресцентних міток *in vivo* дозволило безпосередньо продемонструвати цей процес. Вивільнення ензимів НПП в кров призводить до модифікації циркулюючих імунних комплексів та молекул імуноглобулінів, що також чинить системний запальний вплив. ВЛВХД та ВФД супроводжується зростанням рівня еластази нейтрофілів в крові після 35 днів перебування тварин на дієті. Блокування НПП фраксипарином зменшувало рівень еластази нейтрофілів в крові. Усунення нейтрофілів з крові запобігало розвитку ознак НАСГ в печінці та запобігало зростанню кількості НПП в жовчному міхурі та протоках. При НАСГ спостерігалось також порушення мікроциркуляторного русла печінки, зокрема порушення перенесення сполук із

крові в тканини печінки внаслідок мікрооклюзії капілярів. Отримані результати доводять участь НПП в ушкодженні тканин печінки при НАСГ.

Зв'язок нейтрофільних гранулоцитів із запаленням печінки та утворенням каменів у жовчних протоках достеменно не відомий, проте у роботі [73] показано, що жовчні кислоти індують експресію прозапальних цитокінів у гепатоцитах мишей *Abcb4*^{-/-}, що ініціює запальну відповідь. Ця запальна відповідь відіграє важливу роль у розвитку холестатичного ушкодження печінки. Показано [243], що обробка людських гепатоцитів різними концентраціями глікохенодеоксихолевої кислоти, співмірними з тими, що виявлені у пацієнтів з холестатичним ушкодженням печінки, призводила до зростання рівня некрозу гепатоцитів без зростання рівня апоптозу. Некроз супроводжувався появою в сироватці пацієнтів маркерів некрозу, зокрема білка HMGB1. Даний білок також володіє функцією прозапального цитокіну та ендогенної молекули-небезпеки [244] і здатний активувати утворення НПП [245] та системний запальний процес [246]. Дія жовчних кислот також індуює експресію прозапальних генів у гепатоцитах [74].

В останніх роботах також описано [247], що саме системна запальна відповідь індуює некроз клітин печінки (на противагу більш ранньому уявленню про роль апоптозу, опосередкованому прямим впливом жовчних кислот) та спричиняє холестатичне ушкодження печінки. Молекулярні механізми дії жовчних кислот на запалення печінки описані в нещодавній роботі групи під керівництвом J.Boyer [75].

Активация формування НПП за дії кристалів холестерину та MSU є цілком можливим варіантом у розвитку НАЖХП та НАСГ. Оклюзія жовчних проток з наступним холестазом може спричинити пошкодження гепатоцитів [73] та запалення печінки [74] через дію жовчних кислот [75]. Такий стан цілком можливий і за дієти з високим вмістом холестерину.

Отже, ВЛВХД призводить до ліпідної дегенерації печінки, а також системної (запальної) відповіді, і характеризується у тварин усіма ознаками, притаманними спершу НАЖХП (до 4 тижнів дієти), а згодом і НАСГ (після 4 тижнів). ВФД спричиняє ушкодження гепатоцитів внаслідок виснаження їх енергетичних запасів,

а продукти їх деградації сприяють утворенню кристалів MSU та реакції нейтрофілів шляхом утворення НПП.

Високий вміст холестерину в дієті стимулює його кристалізацію з формуванням нано- та мікрочасточкових кристалів у жовчних каналцях та міжчасточкових жовчних протоках. Кристали індукують нейтрофільні гранулоцити до формування НПП, які за великої кількості агрегують та ініціюють формування жовчних каменів у міжчасточкових жовчних каналцях (рис. 4.5, А, позначені зеленим), а згодом і у жовчних міхурах та протоках гепатобіліарної системи [11]. Утворення каменів в тих жовчних протоках, які знаходяться в тканині печінки, індукує витік жовчі. Відомо, що жовч поза захисним епітелієм жовчних проток прямо чи опосередковано ініціює ушкодження тканин печінки [121–125]. Дані, щодо розвитку НАСГ за умов високоліпідної дієти у щурів, тварин, що не мають жовчного міхура, вказує на той факт, що саме мікрооклюзія жовчних проток, а не загальної вивідної жовчної протоки, відповідає за патологічне переродження тканин. Очевидно, що камені, які виявляються у загальній жовчній протоці чи в жовчному міхурі є лише макроскопічною демонстрацією процесу і вони не завжди пов'язані з НАСГ.

При ВФД послідовність ушкоджуючих подій є іншою: високий вміст фруктози знижує рівень АТФ в гепатоцитах та стимулює його перетворення в сечову кислоту (див. розділ 3). Загибель гепатоцитів від нестачі енергії спричиняє витік внутрішньоклітинних уратів у позаклітинне середовище, або в жовчні каналці (рис. 4.5, Б, позначені жовтим). При контакті з натрієм позаклітинного середовища чи компонентами жовчі відбувається кристалізація сечової кислоти у нанокристали MSU. Вони активують нейтрофільні гранулоцити до утворення НПП та формування наступних запальних процесів. Тому високофруктозна дієта та високохолестеринова дієта мають подібний вплив на утворення НПП у гепатобіліарній системі, що супроводжується руйнуванням гепатоцитів та викидом компонентів НПП через капіляри печінки у кров'яне русло, спричиняючи системне запалення, як це підсумовано на рис. 4.5.

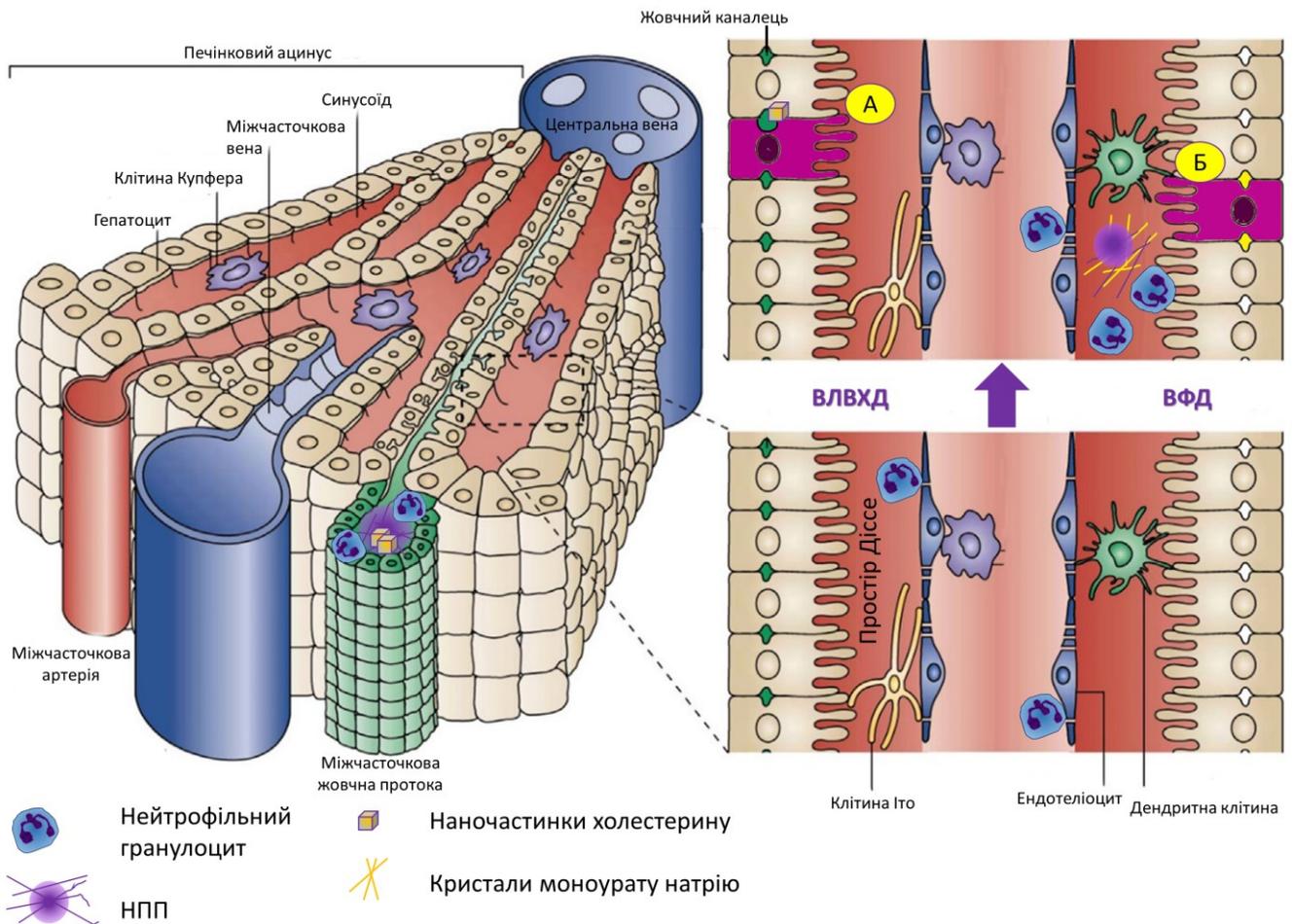


Рис. 4.5. Ушкодження тканин печінки за дії ВЛВХД та ВФД. Малюнок базується на даних [248].

Формування ендогенних частинок холестерину за ВЛВХД є очікуваним явищем, описаним в літературі, хоч про роль НПП в даному процесі було невідомо. Водночас нами вперше описана участь фруктози, як індуктора активації ендогенних НПП. Показано не лише формування НПП в гепатобіліарній системі, а й вплив фруктози на системне помірно запалення з активацією нейтрофільних ензимів у селезінці. Дієта разом із іншими факторами середовища відповідає за більш ніж 70 % ризиків, що спричиняють утворення аутоімунних захворювань [180]. У дисертаційній роботі вперше показали, що наслідками активації НПП за ВЛВХД та ВФД є не лише НАСГ, а формування системного запального процесу.

Виявлена нами закономірність матиме важливий вплив на перегляд ролі раціону у розвитку системних запальних процесів, а показане нами явище впливу

високосольової дієти на пригнічення життєдіяльності нейтрофілів на формування НПП відкриває нові підходи до розробки майбутніх терапевтичних препаратів.

Нами вперше використано імуноферментний тест для виявлення амінокінцевого пептиду проколагену III, тканинного інгібітора металопротеїназ-1 та гіалуронової кислоти для детекції змін в сироватці мишей. Даний тест для детекції зазначених компонентів у сироватці людини відомий як Enhanced Liver Fibrosis розробки Siemens [111], він базується на молекулярних маркерах, що у багатопараметричному аналізі ознак НАСГ в людини показали сильний зв'язок із захворюванням ще до появи клінічних ознак. Оскільки тест базується на молекулярних антигенах, а не на активності внутрішньоклітинних ензимів, його точність є значно вищою.

Варто зазначити, що традиційні (часто використовувані) підходи до ушкоджень печінки, такі як АЛТ, АСТ не є специфічними і не можуть застосовуватись до зразків крові мишей, яка схильна до лізису (Стандарт C56-A Інститут клінічних та лабораторних стандартів) [249]. Іншою перевагою тесту є потреба у незначних кількостях сироватки для аналізу, можливість аналізу заморожених проб. Варто зазначити, що пошук запальних маркерів у зразках сироваток при дієтах, зокрема пошук запальних цитокінів, здійснювався в ряді робіт. Проте, цитокіни мають дуже короткий час перебування в крові, водночас в роботі [25] описано факт руйнування цитокінів за дії утворених НПП. І дійсно, в роботі [250] при дослідженні гіперкалорійної високоліпідної високовуглеводної дієти у щурів спостерігали фенотипові, поведінкові ознаки, спостережувані нами при ВЛВХД, а також ушкодження печінки, проте спостережувані рівні прозапальних цитокінів, наприклад CCL2 та IL-1b хоч і були дещо підвищені у порівнянні з контрольною групою, дані зміни були не достовірні. В роботі [251] описано зростання сироваткових рівнів TNF-а, IL-6, IL-10 для ВФД, а в роботі [252] – зростання TNF-а, IL-1b, IL-6, CCL2, CCL6 для ВЛВХД.

У роботі вперше запропоновано фармацевтично доступні сполуки (фраксипарин, метопролол), здатні впливати на НПП у гепатобіліарній системі. На основі отриманих даних нами було зроблено висновок, що хоч усунення

нейтрофілів не зупиняє метаболічний синдром (зростання маси тіла), проте ураження тканин печінки за умов ВЛВХД та ВФД стає достовірно меншим при руйнуванні в організмі нейтрофілів.

Наведені дані дозволяють нам вважати нашу гіпотезу про участь НПП в ушкодженні тканин печінки, що супроводжується системною запальною реакцією, доведеною.

4.3. Стимулювання імунної відповіді за допомогою керованого впливу на НПП

Сильна та самообмежуюча імунна відповідь, як та, що стимулюється НПП, є необхідною для успішної імунізації з метою забезпечення сильної, проте контрольованої імунної відповіді на введений в організм антиген. Цю відповідь забезпечують ад'юванти, вибір яких для людських вакцин є дуже обмеженим [253]. Так, нещодавно повідомлялося про участь НПП в опосередкуванні дії гідроксиду алюмінію як ад'юванту вакцин [58]. Нанодіаманти, а також гідрофобні полістирольні НЧ також демонстрували сильний ад'ювантний ефект, що діє через самообмежувальну імунну активацію і включає формування НПП [4]. Це було справедливо навіть за умови стерильного запалення [26]. Тож логічним було дослідити інші форми вуглецю на здатність індукувати НПП. Існують дані, що графен оксид (GO) діє як цитотоксичний засіб, залежно від дози, розміру та товщини шару GO. GO може послаблювати імунну відповідь [254], а відновлений GO застосовується як теплопоглинальний засіб у різних медичних застосунках [255].

Як продемонстрували наші дослідження, потрібно ретельно враховувати безпечність застосування GO в організмі, оскільки нейтрофіли не в змозі секвеструвати цей тип наноконструкції. Досліджуваний GO не був локалізований/секвестрований НПП, але займав весь простір порожнин повітряного мішка. Вуглецеві нанотрубки здатні пошкодити плазматичну мембрану і також спричинити перерозподіл ліпідів [256]. При відносно високих

концентраціях С-точки можуть проявляти цитотоксичність та модулювати гуморальну імунну відповідь [257]. Щодо ад'ювантних властивостей водорозчинних похідних фулеренів C60, то в літературі описані суперечливі дані. Деякі дослідження повідомляють, що імунізація похідними C60 призводить до утворення специфічних антитіл класу IgG [258], в той час як в інших роботах показано, що похідні C60 не індукували жодної антитіло-залежної відповіді [259].

Пандемія коронавірусу поставила перед суспільством нові виклики щодо гострої потреби у технологіях швидкого створення анти-коронавірусних вакцин, і зокрема таких, які б були ефективні до змінених штамів вірусу.

Перехресна імунна реактивність між коронавірусами стала критичним питанням, оскільки вона приносить нові можливості захисту від COVID-19. З іншого боку, ця перехресна реактивність може бути негативною, оскільки наявна перехресна реактивність щодо коронавірусів зробить коронавіруси не найкращим вибором для векторів у вакцинах, особливо беручи до уваги останні дані про широку перехресну реакцію імунітету [260]. Повідомлялося, що пули епітопів, які виявляють CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітини у 100 % і 70 % пацієнтів з реконвалесценцією COVID-19 відповідно, розпізнають білки S і M SARS-CoV-2. Реактивність Т-клітин на епітопи SARS-CoV-2 також виявляється у осіб, які не зазнавали впливу [225]. У пацієнтів з SARS-CoV-2 S-реактивні CD4⁺ Т-клітини однаково націлені на N-кінцеву та С-кінцеву частини білка, тоді як у здорових донорів S-реактивні CD4⁺ Т-клітини реагують майже виключно на С-кінцеву частину. Ця частина характеризується вищою гомологією до спайк глікопротеїну ендемічних коронавірусів людини «застиуди» і містить субдиницю S2 з цитоплазматичним пептидом (CP), пептидом злиття (FP) і трансмембранним доменом (TM), але не рецептор-зв'язуючий домен (RBD). S-реактивні CD4⁺ Т-клітини від пацієнтів з SARS-CoV-2 також відрізняються від здорових донорів, оскільки вони коекспресували вищі рівні CD38 та HLA-DR, що свідчить про їх недавню активацію *in vivo* [213]. Наявні в організмі людини CD4⁺ Т-клітини пам'яті, утворені після контакту з коронавірусами, що викликають застуду, перехресно реагують зі схожим за спорідненістю до SARS-CoV-2 та простудних коронавірусів

НCoV-OC43, НCoV-229Е, НCoV-NL63 або НCoV-НКУ1 антигенів. І це може частково пояснити велику неоднорідність важкості перебігу при COVID-19 [223]. Консервативна природа С-кінцевої частини спайк білка забезпечує передумови для розвитку крос-коронавірусних імунних відповідей, як клітинних, так і гуморальних. Це продемонстрован в нашій роботі за допомогою гуморальної імунної відповіді антитіл типу IgG.

Вакцини зробили значний внесок у великі досягнення в галузі охорони здоров'я завдяки лікуванню та профілактиці інфекційних захворювань [261, 262]. Незважаючи на успішне використання вакцин проти кору, гепатиту В, правця та інших, існує багато вірусних і бактеріальних захворювань, вакцини проти яких залишаються недоступними. Основні проблеми у пошуку вакцин проти інфекційних захворювань, пов'язані з вибором природи епітопів, проти яких спрямована імунна відповідь [263, 264].

Переважає більшість вакцин, доступних для використання людиною, є композиціями на основі вірусу або білка. Інактивовані або ослаблені віруси можуть стимулювати стійку імунну відповідь, оскільки вони містять В- і Т-клітинні епітопи у конформації, відповідній патогену. Вакцини на основі пептидів і білків зазвичай складаються з очищеного пептиду/білка з вірусу, або інфікованих вірусом клітин, або рекомбінантних антигенів. Такі субодичні вакцини мають обмеження щодо імуногенності, а для ефективної стимуляції імунної системи потрібні багаторазові ін'єкції або додавання ад'ювантів [58]. У протоколах пептидної вакцинації необхідний епітоп, кон'югований з білком-носієм або представлений у полівалентному форматі на НЧ [59]. Такий підхід дозволяє підвищити імунну систему завдяки імуногенним властивостям носія.

Велику увагу в біомедичному контексті нещодавно привернули малорозмірні матеріали на основі вуглецю (наприклад, фулерен, графен, вуглецеві нанотрубки, вуглецеві квантові точки, наноалмази) [265–268]. Особливо привабливими для біомедичних застосувань вважаються нанодіаманти (НД), оскільки вони менш токсичні, ніж інші наноструктури на основі вуглецю [269, 270]. Є кілька вивчених прикладів їх безпечного біомедичного застосування, наприклад для запобігання

утворення біоплівкам. У цьому контексті ефективне інгібування адгезії *E. coli* до еукаріотичних клітин і зменшення утворення біоплівки *E. coli* було продемонстровано за допомогою модифікованих гліканами НД [271–273]. Крім того, в численних дослідженнях для вирішення проблем у розробці вакцини використовувалися флуоресцентні властивості НД [274, 275], адже притаманна НД флуоресценція дозволяє легко візуалізувати ці структури. Kossovossy та колеги [276] запропонували використовувати нанодіаманти, вкриті целобіозою, як носій антигенів адгезивного білка мідій (MAP) для генерації антигенспецифічних антитіл. Pham та колеги [277] використовували поверхнево-окиснені НД з очищеним білком тримерного гемаглютинину (H7) для імунізації мишей і продемонстрували їхні ад'ювантні властивості. Одним з важливих критеріїв у розробці ад'ювантів на основі НЧ і, зокрема концепцій вакцин на основі наноалмазів, є вплив розміру НЧ алмазу на результуючу імунну відповідь [3]. Запалення, опосередковане нейтрофілами, також виявилось основним механізмом посилення ад'ювантних властивостей нановолокон оксиду алюмінію (Al_2O_3 NW) [75].

Наші дані свідчать про те, що модифіковані пептидами НД, ефективно посилюють імунну відповідь у мишей і кролів. У результаті імунна відповідь є досить сильною та довговічною проти нових інфекційних агентів. Оскільки пептид збудника може бути відносно легко синтезований після секвенування генетичної інформації, запропонований нами підхід може бути цінним як «надзвичайна» вакцина проти нових збудників, прикладом яких є SARS-CoV-2 у цій роботі.

Навіть якщо не забезпечується стерилізуючий імунітет, наявність титрів довгоживучих антитіл, безсумнівно, є корисною. Наявні на 2023 рік дані щодо ефективності використання вакцин проти SARS-CoV-2 також вказують на необхідність певного рівня титрів антитіл, які хоч і не запобігають інфікуванню, однак захищають особу від розвитку (важких форм) хвороби [278].

Тенденція нейтрофілів, присутніх як у крові, тканинах, так і на патрулюючих поверхнях тіла, сприймати наноад'ювант як сторонній об'єкт стимулює їх активацію для виробництва НПП. Останні надійно знерухомлюють наноад'ювант

поблизу місця ін'єкції, не виявляючи слідів у кровообігу чи основних органах. Утворене гранульомоподібне утворення служить безпечним депо антигену і, ймовірно, є основною причиною тривалої імунної відповіді. Компоненти вакцини, такі як НЧ та синтезатор пептидів, можуть стати компонентами віддалених місій у місця з високим ризиком невідомих інфекцій та можливості виробництва вакцин на місці.

4.4. НПП як модулятор системної імунної відповіді

Виявлені в роботі закономірності впливу ендогенних та екзогенних НЧ на ушкодження гепатобіліарної системи та розвиток системного запального процесу є вагомими не лише для лікування гепатологічних патологій.

Поєднання надмірного утворення НПП та їх подальшої агрегації несе небезпеку механічної закупорки проток і судин. Це стосується оклюзії кровоносних судин [15], проток підшлункової залози [50], ініціюванні утворення жовчних каменів із закупоркою жовчних проток [11], оклюзії проток мейбонієвих залоз ока [279] та деяких інших наслідків. Виділяють окремий розділ захворювань, спричинених агрегованими НПП – оклюзійні захворювання, індуковані НПП [280]. Цікаво, що нейтрофіли мають тенденцію утворювати позаклітинні пастки при високій концентрації навіть за відсутності певного інфекційного тригера (або тригер наразі невідомий). Тому неконтрольована або надмірна продукція НПП може викликати загострення запалення та розвитку аутоімунної відповіді, поширення метастазів пухлини та тромбозу [281]. Зазвичай ми маємо захисний механізм проти надмірного згортання крові. Циркуючі ДНКаз 1 і ДНКаз 3 [46] запобігають утворенню НПП у кровообігу, а збій обох ферментів у генетично модифікованих організмах призводить до згортання крові та тромбозу дрібних судин (найменших судин у нашому тілі, в мозку і легенях). Останні дані свідчать про можливу участь НПП у важкій малярії, причому НПП є домінуючим фактором васкулопатії [6]. Саме ця васкулопатія є причиною смертності від COVID [10, 282].

Ми припускаємо [196, 197], що НПП також є причиною поліорганної недостатності, яка зазвичай супроводжує SIRS або сепсис, оскільки ми спостерігали багато «базофільних», ДНК-вмісних згустків у віддалених, імовірно неуразених органах у зразках аутопсії за умов поліорганної недостатності. Водночас, як описано у даній роботі, дія низькомолекулярних гепаринів запобігає формуванню агрегованих НПП *ex vivo*, а саме така терапія застосовується для лікування зазначених станів.

Отже, надмірне утворення НПП може бути запропоноване для посилення імунної відповіді. Той факт, що надмірна гіперреакція на комплекси тромбоцитів із формуванням НПП стала причиною коагулопатій, як рідкісного побічного наслідку дії вакцини ChAdOx1 nCov-19, підтверджує важливу роль НПП як системного модулятора запалення [283]. Тип імунної відповіді до патологічних чинників залежить від статевої приналежності. Зокрема у чоловіків, нейтрофільні гранулоцити схильні до дегрануляції, а у жінок – до формування НПП, в роботі опублікованій в журналі *Nature Aging* [284] цим феноменом автори пояснюють різну тривалість життя чоловіків та жінок.

Ми сподіваємося, що нещодавні досягнення фахівців дослідження агрегованих НПП [5, 11, 285] та результати представлені в нашій роботі, зрештою допоможуть нам лікувати багато станів, клінічна причина яких раніше не була зрозуміла.

ВИСНОВКИ

У роботі вперше доведено вплив нейтрофільних позаклітинних пасток, що виникають у відповідь на дію ендогенних наночастинок при високоліпідній високохолестериновій (ВЛВХД) та при високофруктозній (ВФД) дієтах, на ушкодження тканин гепатобіліарної системи та розвиток системного запалення, запропоновано фармакологічно доступні інгібітори для блокування запальних процесів при ВЛВХД та ВФД.

Запропоновано використання екзогенних наночастинок для керованого посилення імунної відповіді за участю НПП, зокрема в якості ад'юванта вакцин.

Створено кон'югати нанодіамантів (ад'ювант) та коронавірусних пептидів (антиген), що індукували утворення НПП та забезпечували утворення імунної відповіді до антигенів коронавірусів SARS-CoV-2. Зокрема, нами встановлено:

1. ВЛВХД і ВФД індукують утворення НПП у гепатобіліарній системі та розвиток неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) у лабораторних тварин. За цих умов зафіксовано підвищення ($p < 0.05$) рівня еластазної активності нейтрофілів у сироватці крові тварин через 6 тижнів перебування на вказаних дієтах, і особливо на ВФД, де активність ензиму зросла вдвічі.
2. Констатовано, що ВЛВХД і ВФД спричиняють зміни глікозилювання імунологбулінів IgG, з появою прозапального фенотипу із зростанням ($p < 0.0001$) експонування корових фукозильних залишків, що розпізнаються лектинами LCA та AAL. Саме такий тип змін глікозилювання відтворюється *ex vivo* за інкубації білків сироватки з утвореними НПП при 37°C, але не при 4°C.
3. Утворені за ВЛВХД та ВФД нейтрофільні позаклітинні пастки спричиняють розвиток системного запального процесу в організмі тварин. Про що свідчать зростання ($p < 0.01$) рівня циркулюючих імунних комплексів IgG-IgM у сироватці крові мишей вже на 28 добу перебування

на ВЛВХД, а також активність еластази нейтрофілів у печінці та селезінці, де сигнал маркера вказаного ензиму виявлявся серед утворених НПП *in vivo*.

4. Усунення нейтрофілів з організму мишей за допомогою лізуючих антитіл зменшує ($p < 0.01$) ознаки НАСГ за ВЛВХД, знижує ($p < 0.05$) рівень еластазної активності нейтрофілів, зменшує кількість утворених НПП і жовчних каменів у жовчних шляхах.
5. Використання інгібіторів формування НПП на різних рівнях, зокрема – екстравазації нейтрофілів (метопролол), іммобілізації нейтрофілів з кісткового мозку (gCSF), агрегації НПП (гепарин) знижує рівень системних запальних маркерів в організмі, зокрема еластазної активності нейтрофілів ($p < 0,05$) та призводить до зменшення ознак НАСГ. Найбільш ефективним інгібітором, виявилась дія гепарину. За такого впливу зменшувалось ($p < 0.001$) накопичення ліпідів у тканинах печінки для ВЛВХД та ВФД. Високий вміст натрію у середовищі, що спостерігався при високосольовій дієті, також зменшував ($p < 0.001$) інтенсивність утворення НПП.
6. Показано, що екзогенні наночастинки також здатні індукувати утворення НПП. Після введення в організм нанодіаманти секвеструються НПП і через деякий час перетворюються в гранульоми із сполучної тканини, без зон некрозу чи запалення.
7. Здійснено пошук пан-коронавірусних пептидів, які викликали перехресну імунну відповідь до антигенів вірусів MERS та SARS-CoV-2, виявлено пептиди вірусу MERS, які розпізнавались сироватками реконвалесцентних хворих на COVID, але не здорових донорів ($p < 0.0001$). В такий спосіб доведено існування перехресної гуморальної імунної відповіді до SARS-CoV-2.
8. Кон'югація нанодіамантів з пептидами коронавірусів дозволила використовувати їх як вакцини, що забезпечували клітинну (посилена реакція гіперчутливості сповільненого типу, $p < 0.05$) і гуморальну

(зростання рівня специфічних IgG, $p < 0.05$; титр антитіл – 1/4000) відповідь у мишей і кролів, титр утворених антитіл класу IgG зберігався в крові принаймні 120 днів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (80-). 2004/03/06. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
2. Ermert D, Zychlinsky A, Urban C. Fungal and bacterial killing by neutrophils. *Methods Mol Biol*. 2008/12/18. 2009;470:293–312.
3. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007/07/17. 2007;5(8):577–82.
4. Muñoz LE, Bilyy R, Biermann MHC, Kienhöfer D, Maueröder C, Hahn J, et al. Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation. *Proc Natl Acad Sci*. 2016 Oct 4;113(40):E5856–65.
5. Bilyy R, Fedorov V, Vovk V, Leppkes M, Dumych T, Chopyak V, et al. Neutrophil Extracellular Traps Form a Barrier between Necrotic and Viable Areas in Acute Abdominal Inflammation. *Front Immunol*. 2016 Oct 10;7(OCT).
6. Boeltz S, Muñoz LE, Fuchs TA, Herrmann M. Neutrophil Extracellular Traps Open the Pandora’s Box in Severe Malaria. *Front Immunol*. 2017 Jul 28;8.
7. Podolska MJ, Mahajan A, Knopf J, Hahn J, Boeltz S, Munoz L, et al. Autoimmune, rheumatic, chronic inflammatory diseases: Neutrophil extracellular traps on parade. *Autoimmunity*. 2018 Aug 18;51(6):281–7.
8. Mozzini C, Girelli D. The role of Neutrophil Extracellular Traps in Covid-19: Only an hypothesis or a potential new field of research? *Thromb Res*. 2020 Jul;191:26–7.
9. Ackermann M, Anders HJ, Bilyy R, Bowlin GL, Daniel C, De Lorenzo R, et al. Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death Differ*. 2021 May 24;
10. Hosseini A, Stojkov D, Fettelet T, Bilyy R, Yousefi S, Simon HU. Transcriptional Insights of Oxidative Stress and Extracellular Traps in Lung Tissues of Fatal COVID-19 Cases. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 31;24(3):2646.

11. Muñoz L, Boeltz S, Bilyy R, Schauer C, Mahajan A, Widulin N, et al. Neutrophil Extracellular Traps Initiate Gallstone Formation. *Immunity*. 2019 Sep;51(3):443-450.e4.
12. Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest*. 1968 May 1;47(5):1043–52.
13. Desai J, Foresto-Neto O, Honarpisheh M, Steiger S, Nakazawa D, Popper B, et al. Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Sci Rep*. 2017 Dec 3;7(1):1–10.
14. Sisirak V, Sally B, D'Agati V, Martinez-Ortiz W, Özçakar ZB, David J, et al. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell*. 2016 Jun 30;166(1):88–101.
15. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819–35.
16. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 2018 Feb 20;9.
17. Fingerhut L, Dolz G, de Buhr N. What Is the Evolutionary Fingerprint in Neutrophil Granulocytes? *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 25;21(12):4523.
18. Луцик ОД, Чайковський ЮБ, Барінов ЕФ, Білаш СМ, Білий РО, Бобришева ІВ, et al. Гістологія. Цитологія. Ембріологія. Вінниця: Нова Книга, Вінниця; 2018.
19. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*. 2013 Oct;94(4):595–601.
20. Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. Vol. 37, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 334–45.
21. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, Cassatella MA, Zychlinsky A, Hedrick CC, et al. Neutrophils : New insights and open questions. 2018;4579(December).

22. Aroca-Crevillén A, Adrover JM, Hidalgo A. Circadian Features of Neutrophil Biology. *Front Immunol.* 2020;11:576.
23. Cerecedo D, Martínez-Vieyra I, López-Villegas EO, Hernández-Cruz A, Loza-Huerta A del C. Heterogeneity of neutrophils in arterial hypertension. *Exp Cell Res.* 2021 May;402(2):112577.
24. Leppkes M, Schick M, Hohberger B, Mahajan A, Knopf J, Schett G, et al. Updates on NET formation in health and disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2019 Dec;49(3):S43–8.
25. Schauer C, Janko C, Munoz LELE, Zhao YY, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.* 2014 Apr 28;20(5):511–7.
26. Biermann MHC, Podolska MJ, Knopf J, Reinwald C, Weidner D, Maueröder C, et al. Oxidative burst-dependent NETosis is implicated in the resolution of necrosis-associated sterile inflammation. *Front Immunol.* 2016;7(DEC).
27. Gurusamy KSS, Pallari E, Hawkins N, Pereira SPP, Davidson BRR. Management strategies for pancreatic pseudocysts. *Cochrane database Syst Rev.* 2016 Apr;4(4):CD011392.
28. Bunting H. Interstitial desoxyribonucleic acid following cell death. *Yale J Biol Med.* 1950 Jul;22(6):521–5.
29. Vainio T, Koskimies O, Perlmann P, Perlmann H, Klein G. In vitro cytotoxic effect of lymphoid cells from mice immunized with allogeneic tissue. *Nature.* 1964 Oct;204(4957):453–5.
30. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007/01/11. 2007 Jan 15;176(2):231–41.
31. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 2012 Jul;122(7):2661–71.

32. Gloude NJ, Khandelwal P, Luebbering N, Louder DT, Jodele S, Alder MN, et al. Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD. *Blood*. 2017;130(10):1259–66.
33. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Mar;5(178):178ra40.
34. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: Analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jun;16(3):R122.
35. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2011 Jul;187(1):538–52.
36. Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RHP, Buckle AM, et al. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol*. 2008 Sep;10(9):1765–74.
37. Malachowa N, Kobayashi SD, Freedman B, Dorward DW, DeLeo FR. Staphylococcus aureus Leukotoxin GH Promotes Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J Immunol*. 2013 Dec;191(12):6022–9.
38. Konig MF, Giles JT, Teles RP, Moutsopoulos NM, Andrade F. Response to comment on “Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis.” *Sci Transl Med*. 2018;10(433):369ra176.
39. Konig MF, Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Front Immunol*. 2016;7(NOV):461.
40. Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol*. 2013;4(FRB):38.

41. Alexandrescu V, Vincent G, Ngongang C, Ledent G, Hubermont G. Tibial microdissection for diabetic wounds. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2012;53(1):101–6.
42. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Mar;112(9):2817–22.
43. Romero V, Fert-Bober J, Nigrovic PA, Darrah E, Haque UJ, Lee DM, et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Oct;5(209):209ra150.
44. Dumych T, Paryzhak S, PESHKOVA S, BILA G, LUTSYK O, BILYY P, et al. How Can the Death of Cells Be Useful For a Human Body? *Exp Clin Physiol Biochem*. 2018 Sep 9;2018(2):77–85.
45. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UAA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci*. 2010/05/05. 2010 May 25;107(21):9813–8.
46. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017 Dec 1;358(6367):1202–6.
47. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):623–5.
48. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017 Mar 7;23(3):279–87.
49. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):134–47.
50. Leppkes M, Maueröder C, Hirth S, Nowecki S, Günther C, Billmeier U, et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nat Commun*. 2016;7(March):10973.

51. Gunzer M. Escaping the traps of your own hunters. *Science* (80-). 2017 Dec 1;358(6367):1126–7.
52. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2020 Jun 1;217(6):1–7.
53. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*. 2020 Aug;58:102925.
54. Jiao Y, Li Z, Loughran PA, Fan EK, Scott MJ, Li Y, et al. Frontline Science: Macrophage-derived exosomes promote neutrophil necroptosis following hemorrhagic shock. *J Leukoc Biol*. 2017 Feb;103(2):jlb.3HI0517-173R.
55. Agudo-Canalejo J, Lipowsky R. Critical Particle Sizes for the Engulfment of Nanoparticles by Membranes and Vesicles with Bilayer Asymmetry. *ACS Nano*. 2015 Apr 28;9(4):3704–20.
56. Prylutska S, Bilyy R, Overchuk M, Bychko A, Andreichenko K, Stoika R, et al. Water-soluble pristine fullerenes C60 increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane. *J Biomed Nanotechnol*. 2012;8(3):522–7.
57. Mulay SR, Honarpisheh MMMM, Foresto-Neto O, Shi C, Desai J, Zhao ZBZB, et al. Mitochondria permeability transition versus necroptosis in oxalate-induced AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(10):1857–69.
58. Stephen J, Scales HE, Benson RA, Erben D, Garside P, Brewer JM. Neutrophil swarming and extracellular trap formation play a significant role in Alum adjuvant activity. *npj Vaccines*. 2017;2(1):1.
59. Bilyy R, Paryzhak S, Turcheniuk K, Dumych T, Barras A, Boukherroub R, et al. Aluminum oxide nanowires as safe and effective adjuvants for next-generation vaccines. *Mater Today*. 2019 Jan;22:58–66.
60. Drew L. Fighting the fatty liver. *Nature*. 2017 Oct 11;550(7675):S102–3.

61. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980 Jul;55(7):434–8.
62. Targher G, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging driving force in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017 May 20;13(5):297–310.
63. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73–84.
64. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA.* 2015 Jun 9;313(22):2263–73.
65. Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Semin Liver Dis.* 2015 Aug;35(3):270–90.
66. Stender S, Kozlitina J, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. *Nat Genet.* 2017 Jun;49(6):842–7.
67. Mann JP, Anstee QM. NAFLD: PNPLA3 and obesity: a synergistic relationship in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jun 14;14(9):506–7.
68. Guzman CB, Duvvuru S, Akkari A, Bhatnagar P, Battioui C, Foster W, et al. Coding variants in PNPLA3 and TM6SF2 are risk factors for hepatic steatosis and elevated serum alanine aminotransferases caused by a glucagon receptor antagonist. *Hepatol Commun.* 2018 May;2(5):561–70.
69. Nat.Med.Editorial. Cutting out the liver fat. *Nat Med.* 2017 Dec 7;23(12):1385.
70. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England).* 2015 Jan 10;385(9963):117–71.
71. Moore EW. The role of calcium in the pathogenesis of gallstones: Ca⁺⁺ electrode studies of model bile salt solutions and other biologic systems. With an hypothesis on structural requirements for Ca⁺⁺ binding to proteins and bile acids. *Hepatology.* 1984;4(5 Suppl):228S-243S.

72. Carey MC, Small DM. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J Clin Invest.* 1978 Apr 1;61(4):998–1026.
73. Cai SY, Boyer JL. The Role of Inflammation in the Mechanisms of Bile Acid-Induced Liver Damage. *Dig Dis.* 2017;35(3):232–4.
74. Allen K, Jaeschke H, Coppel BL. Bile Acids Induce Inflammatory Genes in Hepatocytes. *Am J Pathol.* 2011 Jan;178(1):175–86.
75. Li M, Cai SYY, Boyer JL. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver. *Mol Aspects Med.* 2017 Aug;56:45–53.
76. Martillo MA, Nazzari L, Crittenden DB. The crystallization of monosodium urate. *Curr Rheumatol Rep.* 2014 Feb;16(2):400.
77. Schorn C, Janko C, Krenn V, Zhao Y, Munoz LE, Schett G, et al. Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front Immunol.* 2012;3(DEC):376.
78. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2018 May;68(5):1063–75.
79. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2008 Jun;48(6):993–9.
80. Macdonald I. Influence of Fructose and Glucose on Serum Lipid Levels in Men and Pre- and Postmenopausal Women. *Am J Clin Nutr.* 1966 May 1;18(5):369–72.
81. Al-Nagdy S, Miller DS, Yudkin J. Changes in Body Composition and Metabolism Induced by Sucrose in the Rat. *Ann Nutr Metab.* 1970;12(4):193–219.
82. Laube H, Klör HU, Fussgänger R, Pfeiffer EF. The Effect of Starch, Sucrose, Glucose and Fructose on Lipid Metabolism in Rats. *Ann Nutr Metab.* 1973;15(4–5):273–80.
83. Maruhama Y, Macdonald I. Incorporation of orally administered glucose-U-14C and fructose-U-14C into the triglyceride of liver, plasma, and adipose tissue of rats. *Metabolism.* 1973 Sep;22(9):1205–15.

84. NIKKILÄ EA. Control of Plasma and Liver Triglyceride Kinetics by Carbohydrate Metabolism and Insulin. In 1969. p. 63–134.
85. Lanaspá MA, Cicerchi C, García G, Li N, Roncal-Jimenez CA, Rivard CJ, et al. Counteracting Roles of AMP Deaminase and AMP Kinase in the Development of Fatty Liver. Calbet JAL, editor. PLoS One. 2012 Nov 9;7(11):e48801.
86. Lanaspá MA, Sanchez-Lozada LG, Choi YJ, Cicerchi C, Kanbay M, Roncal-Jimenez CA, et al. Uric Acid Induces Hepatic Steatosis by Generation of Mitochondrial Oxidative Stress. J Biol Chem. 2012 Nov;287(48):40732–44.
87. van den Berghe G, Bronfman M, Vanneste R, Hers HG. The mechanism of adenosine triphosphate depletion in the liver after a load of fructose. A kinetic study of liver adenylate deaminase. Biochem J. 1977 Mar 15;162(3):601–9.
88. Mäenpää PH, Raivio KO, Kekomäki MP. Liver Adenine Nucleotides: Fructose-Induced Depletion and Its Effect on Protein Synthesis. Science (80-). 1968 Sep 20;161(3847):1253–4.
89. Popa-Nita O, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation. Immunol Cell Biol. 2010 Jan;88(1):32–40.
90. Schorn C, Stryio M, Janko C, Munoz LE, Schett G, Herrmann M. The uptake by blood-borne phagocytes of monosodium urate is dependent on heat-labile serum factor(s) and divalent cations. Autoimmunity. 2010/03/02. 2010 Jan 28;43(3):236–8.
91. Pickles K, Poulter S. How sugar content of our favourite fizzy drinks varies wildly around the world: Top brands found to contain up to SEVEN teaspoons more in some countries. MailOnline. 2015 Oct 1;
92. Jones AP, Kermode AG, Lucas RM, Carroll WM, Nolan D, Hart PH. Circulating immune cells in multiple sclerosis. Clin Exp Immunol. 2017;187(2):193–203.
93. Papadaki G, Kambas K, Choulaki C, Vlachou K, Drakos E, Bertsiás G, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. Eur J Immunol. 2016 Nov;46(11):2542–54.

94. Kawalkowska J, Quirke AM, Ghari F, Davis S, Subramanian V, Thompson PR, et al. Abrogation of collagen-induced arthritis by a peptidyl arginine deiminase inhibitor is associated with modulation of T cell-mediated immune responses. *Sci Rep*. 2016;6(February):1–12.
95. Press D, Kawasaki Y, Aikawa N. Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Ther Clin Risk Manag*. 2014 Aug;10:621.
96. Institute of Laboratory Animal Research C on LSNRC. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academy Press; 1996. 1–140 p.
97. Allen IC. Delayed-type hypersensitivity models in mice. *Methods Mol Biol*. 2013;1031:101–7.
98. Weiss J, Zimmermann F. Tribromoethanol (Avertin) as an anaesthetic in mice. *Lab Anim*. 1999 Apr 24;33(2):192–3.
99. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 2010 Jun 9;7(6):447–9.
100. Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, Deslex P, Keenan C, Mahrt CR, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol*. 2003 Sep;55(2–3):91–106.
101. Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*. 2004 Jul;55(6):413–31.
102. Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Bube A, Keane K, Halm S, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*. 2004 Jul;55(6):433–49.
103. Dumych T, Lutsyk M, Banski M, Yashchenko A, Sojka B, Horbay R, et al. Visualization of melanoma tumor with lectin-conjugated rare-earth doped fluoride nanocrystals. *Croat Med J*. 2014;55(3):186–94.

104. Iacobuzio-Donahue C, Montgomery E. *Gastrointestinal and Liver Pathology*. 2nd Editio. Goldblum J, editor. New York: Saunders; 2011. 736 p.
105. Jean-Marie E. *Histochemical Methods*. In: *Histochemical and Cytochemical Methods of Visualization*. CRC Press; 2013. p. 59–138.
106. Hawley TS, Hawley RG. *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2004. 1–434 p.
107. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017;47(10):1584–797.
108. Магорівська ІБ, Томін АМ, Думич ТІ, Стойка РС, Білий РО. Спосіб оцінки параметрів молекул імуноглобуліну класу IgG у зразках сироватки крові. UA, UA: Патент України на корисну модель 95297; 95297, 2014. p. 1–6.
109. Mahorivska IB, Bilyu RO, Muñoz L, Herrmann M, Stoika RS, Kit YY, et al. Рівень сіалування антигістонових антитіл сироватки крові хворих на системний червоний вовчак. *Біологічні студії/Studia Biol*. 2012;6(3):55–64.
110. Fickentscher C, Magorivska I, Janko C, Biermann M, Bilyu R, Nalli C, et al. The Pathogenicity of Anti-β2GP1-IgG Autoantibodies Depends on Fc Glycosylation. *J Immunol Res*. 2015;2015(JUNE):1–12.
111. Inadomi C, Takahashi H, Ogawa Y, Oeda S, Imajo K, Kubotsu Y, et al. Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis test, and combination of the Enhanced Liver Fibrosis and non-invasive tests for the diagnosis of advanced liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2020 Jun 25;50(6):682–92.
112. Connoley D, Patel PJ, Hogan B, Tanwar S, Rhodes F, Parkes J, et al. The Enhanced Liver Fibrosis test maintains its diagnostic and prognostic performance in alcohol-related liver disease: a cohort study. *BMC Gastroenterol*. 2021 Dec 28;21(1):268.
113. Rabets A, Bila G, Grytsko R, Samborsky M, Rebets Y, Vari SG, et al. The Potential of Developing Pan-Coronaviral Antibodies to Spike Peptides in Convalescent COVID-19 Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2021 Dec 6;69(1):5.

114. Castillo MJ, Nakajima K, Zimmerman M, Powers JC. Sensitive substrates for human leukocyte and porcine pancreatic elastase: a study of the merits of various chromophoric and fluorogenic leaving groups in assays for serine proteases. *Anal Biochem.* 1979 Oct 15;99(1):53–64.
115. Paryzhak S, Dumych T, Mahorivska I, Boichuk M, Bila G, Peshkova S, et al. Neutrophil-released enzymes can influence composition of circulating immune complexes in multiple sclerosis. *Autoimmunity.* 2018 Oct 28;51(6):1–7.
116. Chorna I, Bilyy R, Datsyuk L, Stoika R. Comparative study of human breast carcinoma MCF-7 cells differing in their resistance to doxorubicin: Effect of ionizing radiation on apoptosis and TGF- β production. *Exp Oncol.* 2004;26(2).
117. Pieterse E, Jeremic I, Czegley C, Weidner D, Biermann MHC, Veissi S, et al. Blood-borne phagocytes internalize urate microaggregates and prevent intravascular NETosis by urate crystals. *Sci Rep.* 2016 Dec 5;6(1):38229.
118. Honda M, Kubes P. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jan 31;15(4):206–21.
119. Hilscher MB, Shah VH. Neutrophil Extracellular Traps and Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2019 Nov 14;
120. Farrell G, Schattenberg JM, Leclercq I, Yeh MM, Goldin R, Teoh N, et al. Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology.* 2019 May 12;69(5):2241–57.
121. Monga SP. Lipid metabolic reprogramming in hepatic ischemia–reperfusion injury. *Nat Med.* 2018 Jan 9;24(1):6–7.
122. Ji YX, Huang Z, Yang X, Wang X, Zhao LP, Wang PX, et al. The deubiquitinating enzyme cylindromatosis mitigates nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Med.* 2018 Jan 1;24(2):213–23.
123. Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, Fang J, Wang X, Wang W, et al. An ALOX12–12-HETE–GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia–reperfusion injury. *Nat Med.* 2017 Dec 11;24(1):73–83.

124. Da Silva HE, Teterina A, Comelli EM, Taibi A, Arendt BM, Fischer SE, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with dysbiosis independent of body mass index and insulin resistance. *Sci Rep.* 2018 Dec 23;8(1):1466.
125. Mazzolini G, Atorrasagasti C, Onorato A, Peixoto E, Schlattjan M, Sowa JP, et al. SPARC expression is associated with hepatic injury in rodents and humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2018 Dec 15;8(1):725.
126. Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HCF, Vercesi AE, Castilho RF. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med.* 2013 Oct;63:446–56.
127. Maueröder C, Chaurio RAA, Dumych T, Podolska M, Lootsik MDD, Culemann S, et al. A blast without power - cell death induced by the tuberculosis-necrotizing toxin fails to elicit adequate immune responses. *Cell Death Differ.* 2016 Jun 4;23(6):1016–25.
128. Chaurio RA, Muñoz LE, Maueröder C, Janko C, Harrer T, Fürnrohr BG, et al. The progression of cell death affects the rejection of allogeneic tumors in immune-competent mice - implications for cancer therapy. *Front Immunol.* 2014 Nov 11;5(NOV):560.
129. Chaurio R, Janko C, Schorn C, Maueroder C, Bilyy R, Gaipf U, et al. UVB-irradiated apoptotic cells induce accelerated growth of co-implanted viable tumor cells in immune competent mice. *Autoimmunity.* 2012/12/01. 2013;46(5):317–22.
130. Білий РО. ЗВІТ про НДР Використання позаклітинних нейтрофільних пасток для модулювання запальних процесів. Львів; 2021.
131. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2007;47(4):598–607.
132. Papagianni M, Sofogianni A, Tziomalos K. Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015;7(4):638–48.

133. Ganz M, Bukong TN, Csak T, Saha B, Park JK, Ambade A, et al. Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. *J Transl Med.* 2015;13(1):1–14.
134. Bila G, Schneider M, Peshkova S, Krajnik B, Besh L, Lutsyk A, et al. Novel approach for discrimination of eosinophilic granulocytes and evaluation of their surface receptors in a multicolor fluorescent histological assessment. *Ukr Biochem J.* 2020 Apr 17;92(2):99–106.
135. Matsyura O., Schneider M., Bila G., Peshkova S., Besh L., Lutsyk O., et al. Novel approach for evaluation of cell surface IgE receptors on eosinophils using multicolor fluorescent histology. In: *Materials of 10th RECOOP Annual Project Review Meeting.* Wroclaw, Poland; 2019. p. 81.
136. Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, et al. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2019 Mar 8;26(3):395–408.
137. Bila G, Peshkova S, Dumych T, Bilyy R. Natural cholesterol nanocrystals in gall material and their interaction with neutrophilic granulocytes. In: *PhoBiA Annual Nanophotonics International Conference.* Wroclaw: Wroclaw University of Technology; 2019. p. 62.
138. Біла Г, Віщур О, Білий Р. Високий вміст фруктози в раціоні призводить до утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у жовчних шляхах. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія.* 2020 Apr;89(1).
139. Кутняк М., Біла Г. Участь нейтрофільних гранулоцитів в утворенні кристалів холестеролу у жовчних шляхах лабораторних мишей за високохолестеринової високоліпідної дієти. In: *Materials of 81st Lviv Young Scientists International Conference.* Львів; 2020. p. 32–3.

140. Біла Г., Пешкова С., Віщур О., Білий Р. Утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у жовчному матеріалі за літогенних дієт у лабораторних тварин. In: Матеріали XVIII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини». Львів; 2019. p. 97.
141. Sin YM, Sedgwick AD, Moore A, Willoughby DA. Studies on the clearance of calcium pyrophosphate crystals from facsimile synovium. *Ann Rheum Dis*. 1984 Jun;43(3):487–92.
142. Dumestre-Pérard C, Clavarino G, Colliard S, Cesbron JY, Thielens NM. Antibodies targeting circulating protective molecules in lupus nephritis: Interest as serological biomarkers. *Autoimmun Rev*. 2018 Sep;17(9):890–9.
143. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* (80-). 2006/08/05. 2006 Aug;313(5787):670–3.
144. Chen S, Lu C, Gu H, Mehta A, Li J, Romano PB, et al. Aleuria Aurantia Lectin (AAL)-Reactive Immunoglobulin G Rapidly Appears in Sera of Animals following Antigen Exposure. *PLoS One*. 2012/10/02. 2012;7(9):e44422.
145. Biermann MHC, Griffante G, Podolska MJ, Boeltz S, Stürmer J, Muñoz LE, et al. Sweet but dangerous – the role of immunoglobulin G glycosylation in autoimmunity and inflammation. *Lupus*. 2016 Jul;25(8):934–42.
146. Sjöwall C, Zapf J, von Löhneysen S, Magorivska I, Biermann M, Janko C, et al. Altered glycosylation of complexed native IgG molecules is associated with disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015 May 11;24(6):569–81.
147. Förger F, Østensen M. Is IgG galactosylation the relevant factor for pregnancy-induced remission of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):108.
148. Bond A, Alavi A, Axford JS, Bourke BE, Bruckner FE, Kerr MA, et al. A detailed lectin analysis of IgG glycosylation, demonstrating disease specific changes in terminal galactose and N-acetylglucosamine. *J Autoimmun*. 1997/02/01. 1997;10(1):77–85.

149. Parekh R, Isenberg D, Rook G, Roitt I, Dwek R, Rademacher T. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J Autoimmun.* 1989/04/01. 1989;2(2):101–14.
150. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature.* 1985/08/01. 1985;316(6027):452–7.
151. Magorivska I, Muñoz LEE, Janko C, Dumych T, Rech J, Schett G, et al. Sialylation of anti-histone immunoglobulin G autoantibodies determines their capabilities to participate in the clearance of late apoptotic cells. *Clin Exp Immunol.* 2016;184(1):110–7.
152. Schneider M., Bila G., Vovk V., Bilyy R. High cholesterol and high fructose diets increase serum neutrophil elastase activity in laboratory mice. In: 3rd RECOOP International Student Video Conference. Online; 2020. p. 17.
153. Köller A, Grzegorzewski J, König M. Physiologically Based Modeling of the Effect of Physiological and Anthropometric Variability on Indocyanine Green Based Liver Function Tests. *Front Physiol.* 2021 Nov 22;12.
154. Jeong H, Kim KH, Jo S, Song S. Impact of prognostic nutritional index on the recurrence of hepatocellular carcinoma after a curative resection. *Ann Hepato-Biliary-Pancreatic Surg.* 2021 Nov 30;25(4):456–61.
155. LI-COR Biosciences. Application Note In Vivo Animal Imaging Diet Considerations. 2017. p. 4.
156. Schneider M., Bila G., Vovk V., Karavska A., Vishchur O., Bilyy R. Novel methodology to access liver damage from high fructose and high cholesterol diets. In: 4th RECOOP International Student Conference. Prague; 2022. p. 39.
157. Bila G, Vishchur O, Vari S, Bilyy R. Direct in vivo visualization of activated neutrophils at low-grade inflammation caused by high-fat high-cholesterol diet. In: Vari S, editor. 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference. LA, CA, USA; 2023. p. 124.

158. Higashiyama H, Uemura M, Igarashi H, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, Kanai Y. Anatomy and development of the extrahepatic biliary system in mouse and rat: a perspective on the evolutionary loss of the gallbladder. *J Anat.* 2018 Jan;232(1):134–45.
159. Korolova D, Gryshchenko V, Chernyshenko T, Platonov O, Hornytska O, Chernyshenko V, et al. Blood coagulation factors and platelet response to drug-induced hepatitis and hepatosis in rats. *Anim Model Exp Med.* 2023 Feb 27;6(1):66–73.
160. Pollenus E, Malengier-Devlies B, Vandermosten L, Pham TT, Mitera T, Possemiers H, et al. Limitations of neutrophil depletion by anti-Ly6G antibodies in two heterogenic immunological models. *Immunol Lett.* 2019 Aug;212:30–6.
161. Irving CA, Walker JM, Allen IC, Editor ICA, Walker JM. *Mouse Models of Innate Immunity.* Vol. 1031. 2013.
162. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol.* 2012;3:277.
163. García-Prieto J, Villena-Gutiérrez R, Gómez M, Bernardo E, Pun-García A, García-Lunar I, et al. Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nat Commun.* 2017 Apr 18;8:14780.
164. George I, Sabbah HN, Xu K, Wang N, Wang J. β -Adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines. *Cardiovasc Res.* 2011;91(3):447–55.
165. Giaglis S, Stoikou M, Sur Chowdhury C, Schaefer G, Grimolizzi F, Rossi SW, et al. Multimodal Regulation of NET Formation in Pregnancy: Progesterone Antagonizes the Pro-NETotic Effect of Estrogen and G-CSF. *Front Immunol.* 2016 Dec 5;7.
166. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Aug 7;109(32):13076–81.

167. Castellani S, D’Oria S, Diana A, Polizzi AM, Di Gioia S, Marigliò MA, et al. G-CSF and GM-CSF Modify Neutrophil Functions at Concentrations found in Cystic Fibrosis. *Sci Rep*. 2019 Dec 10;9(1):12937.
168. Boettcher M, Eschenburg G, Mietzsch S, Jiménez-Alcázar M, Klinke M, Vincent D, et al. Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats. *Sci Rep*. 2017;7(1).
169. Bila G, Vishchur O, Vari S, Bilyy R. Neutrophil Extracellular Traps during high fructose diet leads to low-grade inflammation and direct liver damage. *Eur J Immunol*. 2021;51(S1):337.
170. Біла Г, Віщур О, Білий Р. Кількісна оцінка ушкоджень тканин печінки лабораторних мишей за умов високоліпідної високохолестеринової дієти з використанням імуноферментного аналізу. In: Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА). 2021. р. 15–7.
171. Каравська А., Магала О., Біла Г. Кількісний підхід до оцінки ушкодження тканин печінки в моделі стеатогепатозу мишей. In: Materials of 81st Lviv Young Scientists International Conference. Львів; 2020. р. 29–30.
172. Біла Г. Нові неінвазивні методи оцінки ушкодження тканин печінки за неалкогольного стеатогепатиту в тварин. In: XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених. Львів; 2022. р. 23.
173. Daum S, Reshetnikov MSVSV, Sisa M, Dumych T, Lootsik MDMD, Bilyy R, et al. Lysosome-Targeting Amplifiers of Reactive Oxygen Species as Anticancer Prodrugs. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2017 Dec 4;56(49):15545–9.
174. Reshetnikov V, Hahn J, Maueröder C, Czegley C, Munoz LE, Herrmann M, et al. Chemical Tools for Targeted Amplification of Reactive Oxygen Species in Neutrophils. *Front Immunol*. 2018 Aug 13;9(August):1–10.
175. Horbay RO, Manko BO, Manko V V., Lootsik MD, Stoika RS. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma. *Cell Biol Int*. 2012 Jan 1;36(1):71–7.

176. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016 Jul 6;7(1):12150.
177. Li G, Jia J, Ji K, Gong X, Wang R, Zhang X, et al. The neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, attenuates sepsis-related kidney injury in rats. *Int J Mol Med.* 2016 Sep;38(3):767–75.
178. Xu H, Schikora M, Sisa M, Daum S, Klemt I, Janko C, et al. An Endoplasmic Reticulum Specific Pro-amplifier of Reactive Oxygen Species in Cancer Cells. *Angew Chemie Int Ed.* 2021 May 10;60(20):11158–62.
179. Bila G, Lootsyk M, Mokhir A, Vishchur O, Bilyy R. Targeting granulocytic tumor cells with cholic acid prodrug conjugates. In: *Proceedings of the 1st Ukrainian-Polish Scientific Forum AGROBIOPERSPECTIVES.* 2021. p. 13.
180. Azizov V, Dietel K, Steffen F, Dürholz K, Meidenbauer J, Lucas S, et al. Ethanol consumption inhibits TFH cell responses and the development of autoimmune arthritis. *Nat Commun.* 2020 Apr 24;11(1):1998.
181. Jung SM, Kim Y, Kim J, Jung H, Yi H, Rim YA, et al. Sodium Chloride Aggravates Arthritis via Th17 Polarization. *Yonsei Med J.* 2019 Jan;60(1):88–97.
182. Matsumoto T, van der Auwera P, Watanabe Y, Tanaka M, Ogata N, Naito S, et al. Neutrophil function in hyperosmotic NaCl is preserved by phosphoenol pyruvate. *Urol Res.* 1991;19(4):223–7.
183. Nadesalingam A, Chen JHKK, Farahvash A, Khan MA. Hypertonic Saline Suppresses NADPH Oxidase-Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation and Promotes Apoptosis. *Front Immunol.* 2018;9(MAR):359.
184. Krampert L, Bauer K, Ebner S, Neubert P, Ossner T, Weigert A, et al. High Na⁺ Environments Impair Phagocyte Oxidase-Dependent Antibacterial Activity of Neutrophils. *Front Immunol.* 2021;12:712948.
185. Mazzitelli I, Bleichmar L, Melucci C, Gerber PP, Toscanini A, Cuestas ML, et al. High Salt Induces a Delayed Activation of Human Neutrophils. *Front Immunol.* 2022;13:831844.

186. Danziger J, Zeidel ML. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 May 7;10(5):852–62.
187. Sadowski J, Dobrowolski L. The renal medullary interstitium: focus on osmotic hypertonicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003 Mar;30(3):119–26.
188. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schröder A, Kopp C, Siegert I, et al. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab*. 2015 Mar 3;21(3):493–501.
189. Dmitrieva NI, Burg MB. Hypertonic stress response. *Mutat Res*. 2005 Jan 6;569(1–2):65–74.
190. Song W, Ye J, Pan N, Tan C, Herrmann M. Neutrophil Extracellular Traps Tied to Rheumatoid Arthritis: Points to Ponder. *Front Immunol*. 2020;11:578129.
191. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Sep;49(9):1618–31.
192. Monach PA, Mathis D, Benoist C. The K/BxN arthritis model. *Curr Protoc Immunol*. 2008 May;Chapter 15:15.22.1-15.22.12.
193. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1601–8.
194. Vaseruk A, Bila G, Bilyy R. IHC analysis of human neutrophil elastase during NETosis. *Eur J Immunol*. 2022;52(S2):123.
195. Bila G, Rabets A, Bilyy R. Nano- and Microparticles and Their Role in Inflammation and Immune Response: Focus on Neutrophil Extracellular Traps. In: *Biomedical Nanomaterials*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 149–70.
196. Bilyy R, Bila G, Vishchur O, Vovk V, Herrmann M. Neutrophils as Main Players of Immune Response Towards Nondegradable Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2020 Jun 29;10(7):1273.
197. Bilyy R, Bila G. Plasma membrane and nanoparticles: love, hate and immune regulation. *FEBS Open Bio*. 2021 Jul 2;11(S1):66–7.

198. Bila G., Vovk V., Bilyy R. Activation of neutrophils by natural nanocrystals underlies nutrition-related low-grade inflammation: How we can prevent gallstone formation? In: Proceedings of the 15th RECOOP Bridges in Life Science Video Conference. Online; 2020. p. 104.
199. Okudaira M, Schwarz J. Histoplasma capsulatum infection in rat air pouch. Arch Pathol. 1962 Sep;74:239–43.
200. Sedgwick AD, Sin YM, Edwards JCW, Willoughby DA. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. J Pathol. 1983 Dec;141(4):483–95.
201. Edwards JCW, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: An in vivo tissue culture system. J Pathol. 1981 Jun;134(2):147–56.
202. Dalhoff A, Frank G, Luckhaus G. The granuloma pouch: an in vivo model for pharmacokinetic and chemotherapeutic investigations. I. Biochemical and histological characterization. Infection. 10(6):354–60.
203. Hashida R, Chiba K, Yamatsu I, Katayama K. Collagenase production in the exudate of a novel adjuvant-induced air pouch inflammation model in rats. Agents Actions. 1991 Sep;34(1–2):242–3.
204. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. J Clin Invest. 1993 Dec;92(6):2675–82.
205. Martin SW, Stevens AJ, Brennan BS, Reis ML, Gifford LA, Rowland M, et al. Regional drug delivery I: permeability characteristics of the rat 6-day-old air pouch model of inflammation. Pharm Res. 1995 Dec;12(12):1980–6.
206. Eteraf-Oskouei T, Allahyari S, Akbarzadeh-Atashkhosrow A, Delazar A, Pashaii M, Gan SH, et al. Methanolic Extract of Ficus carica Linn. Leaves Exerts Antiangiogenesis Effects Based on the Rat Air Pouch Model of Inflammation. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:760405.

207. Sin YM, Sedgwick AD, Chea EP, Willoughby DA. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: A six day air pouch model in the mouse. *Ann Rheum Dis*. 1986 Oct;45(10):873–7.
208. Paryzhak SY, Dumych TI, Peshkova SM, Bila EE, Lutsyk AD, Barras A, et al. Interaction of 4 allotropic modifications of carbon nanoparticles with living tissues. *Ukr Biochem J*. 2019 Apr 1;91(2):41–50.
209. Парижак СЯ, Думич ТІ, Білий РО. Шляхи активації нейтрофільних гранулоцитів за дії природних гідрофобних нанокристалів. 2018;
210. Парижак С, Думич Т, Біла Г, Білий Р. Застосування моделі «повітряної кишені» для оцінки здатності імунних клітин локалізувати чужорідні нано- та мікрочастинки. *Exp Clin Physiol Biochem*. 2019 Apr 15;2019(1):52–7.
211. Bila G., Vovk V., Bilyy R. Lung damage by nanoparticles at environmental pollution and COVID-19 disease. In: 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Annual Conference. Prague; 2022. p. 140.
212. Schrick L, Tausch SH, Dabrowski PW, Damaso CR, Esparza J, Nitsche A. An Early American Smallpox Vaccine Based on Horsepox. *N Engl J Med*. 2017;377(15):1491–2.
213. Mackay IM, Arden KE. Middle East respiratory syndrome: An emerging coronavirus infection tracked by the crowd. *Virus Res*. 2015 Apr;202:60–88.
214. Liu S, Xiao G, Chen Y, He Y, Niu J, Escalante CR, et al. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet*. 2004 Mar;363(9413):938–47.
215. Xia S, Yan L, Xu W, Agrawal AS, Algaissi A, Tseng CTK, et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv*. 2019 Apr 10;5(4):eaav4580.
216. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* (80-). 2020 Mar 13;367(6483):1260–3.

217. Xia S, Liu Q, Wang Q, Sun Z, Su S, Du L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) entry inhibitors targeting spike protein. *Virus Res.* 2014 Dec;194(January):200–10.
218. Xia S, Liu M, Wang C, Xu W, Lan Q, Feng S, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res.* 2020;30(4):343–55.
219. Yuan Y, Cao D, Zhang Y, Ma J, Qi J, Wang Q, et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun.* 2017 Apr 10;8(1):15092.
220. Brandt BW, Heringa J, Leunissen JAM. SEQATOMS: a web tool for identifying missing regions in PDB in sequence context. *Nucleic Acids Res.* 2008 May;36(Web Server):W255–9.
221. Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, Xiong X, Bosch BJ, Rey FA, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(42):11157–62.
222. Du L, Zhao G, Kou Z, Ma C, Sun S, Poon VKM, et al. Identification of a Receptor-Binding Domain in the S Protein of the Novel Human Coronavirus Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus as an Essential Target for Vaccine Development. *J Virol.* 2013 Sep;87(17):9939–42.
223. Mou H, Raj VS, van Kuppeveld FJM, Rottier PJM, Haagmans BL, Bosch BJ. The Receptor Binding Domain of the New Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Maps to a 231-Residue Region in the Spike Protein That Efficiently Elicits Neutralizing Antibodies. *J Virol.* 2013 Aug;87(16):9379–83.
224. Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, et al. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* 2013 Aug;23(8):986–93.
225. Lu L, Liu Q, Zhu Y, Chan KHH, Qin L, Li Y, et al. Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor. *Nat Commun.* 2014 May 28;5(1):3067.

226. Rabets A, Bila G, Grytsko R, Samborsky M, Rebets Y, Vari S, et al. Development of antibodies to pan-coronavirus spike peptides in convalescent COVID-19 patients. medRxiv. 2020 Jan 1;2020.08.20.20178566.
227. Stümer J, Biermann MHCHC, Knopf J, Magorivska I, Kastbom A, Svärd A, et al. Altered glycan accessibility on native immunoglobulin G complexes in early rheumatoid arthritis and its changes during therapy. *Clin Exp Immunol*. 2017 Sep;189(3):372–82.
228. Platt JL, Cascalho M. IgM in the kidney: a multiple personality disorder. *Kidney Int*. 2015 Sep;88(3):439–41.
229. Bilyy R, Pagneux Q, François N, Bila G, Grytsko R, Lebedin Y, et al. Rapid Generation of Coronaviral Immunity Using Recombinant Peptide Modified Nanodiamonds. *Pathog (Basel, Switzerland)*. 2021 Jul 8;10(7).
230. Alkahtani MH, Alghannam F, Jiang L, Rampersaud AA, Brick R, Gomes CL, et al. Fluorescent nanodiamonds for luminescent thermometry in the biological transparency window. *Opt Lett*. 2018 Jul 15;43(14):3317.
231. VanCott T, Jackson HM. Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols edited by Derek O’Hagan, humana press. Vol. 18, Trends in Biotechnology. 2000. 511 p.
232. Думич Т, Парижак С, Пешкова С, Біла Г, Луцик М, Луцик О, et al. Чим корисна для організму загибель окремих клітин? Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2018 Sep 9;2018(2):77–85.
233. Грицко РЮ, Біла ГІ, Білий РО. Що насправді означає тестування на коронавірус для пацієнта? *Інфекційні хвороби*. 2020;100(2):65–72.
234. Bila G, Vovk V, Kril I, Chopyak V, Bilyy R. Hydrophobic nanoparticles as a novel adjuvant for proteinbased anti-COVID-19 vaccines. In: *Eur J Immunol*. Berlin; 2022. p. 22.
235. Reinwald C, Schauer C, Csepregi JZ, Kienhöfer D, Weidner D, Malissen M, et al. Erratum: Reply to “Neutrophils are not required for resolution of acute gouty arthritis in mice.” *Nat Med*. 2017 Apr;23(4):526–526.

236. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science; 2002. 1–1536 p.
237. Bilyy R, Lutsyk A. A brief account of Julius Planer's life and research. *Condens Matter Phys*. 2010;13(3):370031–3.
238. Tausche AK, Unger S, Richter K, Wunderlich C, Grässler J, Roch B, et al. [Hyperuricemia and gout: diagnosis and therapy]. *Internist (Berl)*. 2006 May;47(5):509–20; quiz 521.
239. Schorn C, Frey B, Lauber K, Janko C, Strycio M, Keppeler H, et al. Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2010/11/06. 2011;286(1):35–41.
240. Schett G, Schauer C, Hoffmann M, Herrmann M. Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout. *RMD Open*. 2015;1(Suppl 1):e000046.
241. Mulay SR, Desai J, Kumar SVS V, Eberhard JN, Thomasova D, Romoli S, et al. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis. *Nat Commun*. 2016/01/29. 2016 Jan 28;7:10274.
242. Ганонг ВФ. *Фізіологія Людини*. втдання ук. Львів: БаК; 2002. 784 p.
243. Woolbright BL, Dorko K, Antoine DJ, Clarke JJ, Gholami P, Li F, et al. Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Mar;283(3):168–77.
244. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279–89.
245. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Front Immunol*. 2016;7(August):1–8.
246. Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*. 2009/11/06. 2009 Nov 5;462(7269):99–103.
247. Woolbright BL. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World J Gastroenterol*. 2012;18(36):4985.

248. Du Y, Li N, Long M. Liver sinusoid on a chip. In 2018. p. 105–34.
249. Smith MB. Hemolysis, Icterus, and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratory Analysis; Approved Guideline. CLSI document C56-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. 64 p.
250. A Hypercaloric Diet Induces Early Podocyte Damage in Aged, Non-Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2021 Dec 23;55(S4):96–112.
251. Ondee T, Pongpirul K, Udompornpitak K, Sukkummee W, Lertmongkolaksorn T, Senaprom S, et al. High Fructose Causes More Prominent Liver Steatohepatitis with Leaky Gut Similar to High Glucose Administration in Mice and Attenuation by *Lactiplantibacillus plantarum* dfa1. *Nutrients*. 2023 Mar 17;15(6):1462.
252. Xu Y, Huang X, Huangfu B, Hu Y, Xu J, Gao R, et al. Sulforaphane Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat and High-Fructose Diet via LPS/TLR4 in the Gut–Liver Axis. *Nutrients*. 2023 Feb 1;15(3):743.
253. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(8):915–28.
254. Bianco A. Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal. *Angew Chemie Int Ed*. 2013 May;52(19):4986–97.
255. Li C, Ye R, Bouckaert J, Zurutuza A, Drider D, Dumych T, et al. Flexible Nanoholey Patches for Antibiotic-Free Treatments of Skin Infections. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(42):36665–74.
256. Prylutska S, Bilyy R, Schkandina T, Bychko A, Cherepanov V, Andreichenko K, et al. Effect of iron-doped multi-walled carbon nanotubes on lipid model and cellular plasma membranes. *Mater Sci Eng C*. 2012 Aug 1;32(6):1486–9.
257. Lategan K, Fowler J, Bayati M, Fidalgo de Cortalezzi M, Pool E. The Effects of Carbon Dots on Immune System Biomarkers, Using the Murine Macrophage Cell Line RAW 264.7 and Human Whole Blood Cell Cultures. *Nanomater (Basel, Switzerland)*. 2018 May;8(6):388.
258. Chen BX, Wilson SR, Das M, Coughlin DJ, Erlanger BF. Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep;95(18):10809–13.

259. Andreev SM, Babakhin AA, Petrukhina AO, Romanova VS, Parnes ZN, Petrov R V. Immunogenic and allergenic properties of fulleren conjugates with aminoacids and proteins. *Dokl Biochem Proc Acad Sci Biochem Sect.* 370(1–6):4–7.
260. Ng KW, Faulkner N, Cornish GH, Rosa A, Harvey R, Hussain S, et al. Pre-existing and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *bioRxiv.* 2020 Jan;2020.05.14.095414.
261. Plotkina SA. Vaccination against the major infectious diseases. *Comptes Rendus l'Académie des Sci - Ser III - Sci la Vie.* 1999 Nov;322(11):943–51.
262. Shen AK, Cooke MT. Infectious disease vaccines. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 Mar 19;18(3):169–70.
263. Arvin AM, Fink K, Schmid MA, Cathcart A, Spreafico R, Havenar-Daughton C, et al. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature.* 2020 Aug 20;584(7821):353–63.
264. Welsh RM, Fujinami RS. Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jul;5(7):555–63.
265. Maiti D, Tong X, Mou X, Yang K. Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. *Front Pharmacol.* 2019 Mar 11;9:1401.
266. Patel KD, Singh RK, Kim HW. Carbon-based nanomaterials as an emerging platform for theranostics. *Mater Horizons.* 2019;6(3):434–69.
267. Cha C, Shin SR, Annabi N, Dokmeci MR, Khademhosseini A. Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for Biomedical Engineering. *ACS Nano.* 2013 Apr 23;7(4):2891–7.
268. Nekoueian K, Amiri M, Sillanpää M, Marken F, Boukherroub R, Szunerits S. Carbon-based quantum particles: an electroanalytical and biomedical perspective. *Chem Soc Rev.* 2019;48(15):4281–316.
269. Zhang X, Hu W, Li J, Tao L, Wei Y. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond. *Toxicol Res (Camb).* 2012 Jul 1;1(1):62–8.
270. Mochalin VN, Shenderova O, Ho D, Gogotsi Y. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat Nanotechnol.* 2012 Jan 18;7(1):11–23.

271. Barras A, Martin FA, Bande O, Baumann JS, Ghigo JM, Boukherroub R, et al. Glycan-functionalized diamond nanoparticles as potent *E. coli* anti-adhesives. *Nanoscale*. 2013;5(6):2307.
272. Turcheniuk V, Turcheniuk K, Bouckaert J, Barras A, Dumych T, Bilyy R, et al. Affinity of Glycan-Modified Nanodiamonds towards Lectins and Uropathogenic *Escherichia Coli*. *ChemNanoMat*. 2016 Apr;2(4):307–14.
273. Khanal M, Larssonneur F, Raks V, Barras A, Baumann JS, Martin FA, et al. Inhibition of type 1 fimbriae-mediated *Escherichia coli* adhesion and biofilm formation by trimeric cluster thiomannosides conjugated to diamond nanoparticles. *Nanoscale*. 2015;7(6):2325–35.
274. Irvine DJ, Hanson MC, Rakhra K, Tokatlian T. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chem Rev*. 2015 Oct 14;115(19):11109–46.
275. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014 Jan;32(3):327–37.
276. Kossovsky N, Gelman A, Hnatyszyn HJ, Rajguru S, Garrell RL, Torbati S, et al. Surface-Modified Diamond Nanoparticles as Antigen Delivery Vehicles. *Bioconjug Chem*. 1995 Sep 1;6(5):507–11.
277. Pham NB, Ho TT, Nguyen GT, Le TT, Le NT, Chang HC, et al. Nanodiamond enhances immune responses in mice against recombinant HA/H7N9 protein. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):1–12.
278. Yadav T, Kumar S, Mishra G, Saxena SK. Tracking the COVID-19 vaccines: The global landscape. *Hum Vaccin Immunother*. 2023 Dec 31;19(1):2191577.
279. Mahajan A, Hasíková L, Hampel U, Grüneboom A, Shan X, Herrmann I, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps occlude Meibomian glands during ocular surface inflammation. *Ocul Surf*. 2021 Apr;20:1–12.
280. Yaykasli KO, Schauer C, Muñoz LE, Mahajan A, Knopf J, Schett G, et al. Neutrophil Extracellular Trap-Driven Occlusive Diseases. *Cells*. 2021 Aug 26;10(9):2208.

281. Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, Ritis K. NETopathies? Unraveling the dark side of old diseases through neutrophils. *Front Immunol.* 2017;7(JAN):1–13.
282. Johnson JE, McGuone D, Xu ML, Jane-Wit D, Mitchell RN, Libby P, et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Coronary Vascular Thrombosis. *Am J Pathol.* 2022 Jan;192(1):112–20.
283. Greinacher A, Selleng K, Palankar R, Wesche J, Handtke S, Wolff M, et al. Insights in ChAdOx1 nCoV-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Blood.* 2021 Dec 2;138(22):2256–68.
284. Lu RJ, Taylor S, Contrepois K, Kim M, Bravo JI, Ellenberger M, et al. Multi-omic profiling of primary mouse neutrophils predicts a pattern of sex- and age-related functional regulation. *Nat Aging.* 2021 Jul 19;1(8):715–33.
285. Daniel C, Leppkes M, Muñoz LE, Schley G, Schett G, Herrmann M. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jun 18;15(9):559–75.

ДОДАТКИ

Додаток А.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора з наукової роботи
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
д.б.н. Чернишенко В.О.



« 20 » 06 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи

Білої Галини Ігорівни

«Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії
наночастинок»

Ми, що нижче підписалися, члени комісії: завідувач лабораторії імунобіології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України д.б.н. Колибо Денне Володимирович, науковий співробітник лабораторії імунобіології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН, к.б.н. Сіромолот Андрій Андрійович, науковий співробітник лабораторії імунобіології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України Жукова Дарія Андріївна, склали даний акт про те, що із 2022 року наукові результати, представлені в дисертаційній роботі Білої Галини Ігорівни, а саме шляхи індукції імунної відповіді з використання нейтрофіл-стимулюючих наночастинок активно використовуються в наукових дослідженнях Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України, зокрема для індукції імунної відповіді до рекомбінантних антигенів.

Джерело інформації:

1. Bilyy, R., Pagneux, Q., François, N., Bila, G., Grytsko, R., Lebedin, Y., Barras, A., Dubuisson, J., Belouzard, S., Séron, K., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2021). Rapid Generation of Coronaviral Immunity Using Recombinant Peptide Modified Nanodiamonds. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(7), 861. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070861>.
2. Bila, G.; Vovk, V.; Bilyy, R. Lung damage by nanoparticles at environmental pollution and COVID-19 disease. 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Annual Conference. (Prague, Czech Republic, April 8, 2022). – P. 140.

Голова комісії _____ д.б.н. проф. Колибо Д.В.

Члени комісії _____ к.б.н. н.с. Сіромолот А.А.

_____ м.н.с. Жукова Д.А.



Wrocław University of Science and Technology

Department of Experimental Physics

Bartosz Krajnik, PhD
Faculty of Fundamental Problems of Technology
Wrocław University of Science and Technology
Wybrzeże Stanisława Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław, Poland

Wrocław, 21.06.2023 r.

To whom it concerns,

I hereby confirm that research data presented in the PhD thesis of Galyna Bila «Involvement of neutrophil extracellular traps in the animal inflammatory processes under the action of nanoparticles» were successfully used in the research activities of the Laboratory for Optical Spectroscopy of Nanostructures at Wrocław University of Science and Technology, particularly data regarding discrimination of neutrophils and eosinophils using aniline blue staining were used for development of discrimination approached in stochastic microscopy.

Based on the data published in:

1. Bila, G., Schneider, M., Peshkova, S., Krajnik, B., Besh, L., Lutsyk, A., Matsyura, O., & Bilyy, R. (2020). Novel approach for discrimination of eosinophilic granulocytes and evaluation of their surface receptors in a multicolor fluorescent histological assessment. The Ukrainian Biochemical Journal, 92(2), 99–106.
<https://doi.org/10.15407/ubj92.02.099>
2. Matsyura, O.; Schneider, M.; Bila, G.; Peshkova, S.; Besh, L.; Lutsyk, O.; Bilyy, R. Novel approach for evaluation of cell surface IgE receptors on eosinophils using multicolor fluorescent histology. Materials of 10th RECOOP Annual Project Review Meeting (October 11–12, 2019; Wrocław, Poland). – P. 81.
3. Bila, G.; Peshkova, S.; Dumych, T.; Bilyy, R. Natural cholesterol nanocrystals in gall material and their interaction with neutrophilic granulocytes. Proceeding of the PhoBiA Annual Nanophotonics International Conference; Wrocław University of Technology: Wrocław, Poland, May 15–17, 2019; P. 62.

Yours sincerely,

Bartosz Krajnik



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Wrocław University
of Science and Technology
Faculty of Fundamental Problems
of Technology
Department of Experimental Physics
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław, Poland
T: +48 71 320 25 79
F: +48 71 328 36 96
wppt.kfd@pwr.edu.pl
www.pwr.edu.pl
REGON: 00001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
д. б. н., проф. _____ Кліщ І. М.
_____ 2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок».
2. **Установа розробника, автор:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра гістології, цитології та ембріології, асистент – Біла Галина Ігорівна.
3. **Джерело інформації:**
 1. Bilyu, R., Bila, G., Vishchur, O., Vovk, V., & Herrmann, M. (2020). Neutrophils as Main Players of Immune Response towards Nondegradable Nanoparticles. *Nanomaterials*, 10(7), 1273. <https://doi.org/10.3390/nano10071273>.
 2. Біла, Г., Віщур, О., & Білий, Р. (2020). Високий вміст фруктози в раціоні призводить до утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у жовчних шляхах. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 89(1), 29–35. <https://doi.org/10.25040/ecpb2020.01.029>.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** у навчальну роботу кафедри гістології та ембріології, в матеріали лекцій та практичних занять, у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** 2022-2023 навчальний рік.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.
8. **Протокол засідання кафедри № 5 від 1 травня 2023 р.**

Відповідальний за впровадження
Завідувач кафедри гістології та ембріології
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
доктор біологічних наук, професор

З. М. Небесна

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

Лікарня Святого Миколая”

МІСЬКІВ Іван



«01» березня 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи Білої Галини Ігорівни
у лікувальній процес

1. Назва впровадження: «Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок»
2. Джерела інформації:
 - Bila, G., Schneider, M., Peshkova, S., Krajnik, B., Besh, L., Lutsyk, A., Matsyura, O., & Bilyy, R. (2020). Novel approach for discrimination of eosinophilic granulocytes and evaluation of their surface receptors in a multicolor fluorescent histological assessment. The Ukrainian Biochemical Journal, 92 (2), 99-106. <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.099>.
 - Matsyura, O.; Schneider, M.; Bila, G.; Peshkova, S.; Besh, L.; Lutsyk, O.; Bilyy, R. Novel approach for evaluation of cell surface IgE receptors on eosinophils using multicolor fluorescent histology. Materials of 10th RECOOP Annual Project Review Meeting (October 11-12, 2019; Wrocław, Poland). – P. 81.
3. Де і коли впроваджено: ВП «Лікарня святого Миколая», відділення старшого дитинства, центр алергології, 2022 рік.
4. Дата початку впровадження: лютий 2022 рік.
5. Загальна кількість спостережень: 24.
6. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації: впроваджено дані щодо шляхів дискримінації нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів крові, та використання запропонованого підходу для детекції маркерів на еозинофільних гранулоцитах методом багатоканальної імуногістохімії.

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, яка проводила впровадження
Позитивний результат	95.83%	91.67%

8. Зауваження, додатки: немає.

Відповідальний за впровадження: д.мед.н., доцент кафедри педіатрії №2, лікар-алерголог
Мацюра Оксана Іванівна

«01» березня 2023 р.



Корм для високоліпідних високо холестеринових дієт C1089, Altromin, склад

altromin

C 1089 - product data sheet

C 1089

lithogenic diet contains 1% cholesterol & 0.5% cholic acid

Metabolized energy

Content	Value	unit
Fat	903 (24%)	kcal/kg
Protein	711 (19%)	kcal/kg
Carbonhydrates	2,140 (57%)	kcal/kg

crude nutrients and moisture

Content	Value	unit
Moisture	66,696 (6.7%)	mg/kg
Crude Ash	57,881 (5.8%)	mg/kg
Crude Fibre	37,918 (3.8%)	mg/kg
Crude Fat	100,359 (10.0%)	mg/kg
Crude Protein	177,860 (17.8%)	mg/kg
Nitrogenfree extractives	559,286 (55.9%)	mg/kg

Carbonhydrates

Content	Value	unit
Monosaccharides	0	mg/kg
Disaccharides	140,500	mg/kg
Polysaccharides	364,580	mg/kg

Minerals

Content	Value	unit
Calcium	9,853	mg/kg
Potassium	7,065	mg/kg
Magnesium	688	mg/kg
Sodium	2,473	mg/kg
Phosphorus	8,090	mg/kg



Trace elements

Content	Value	unit
Aluminium	3.15	mg/kg
Chlorine	3,630.00	mg/kg
Iron	178.27	mg/kg
Flourine	5.22	mg/kg
Iodine	0.52	mg/kg
Cobalt	0.14	mg/kg
Copper	6.64	mg/kg
Manganese	100.86	mg/kg
Molybdenum	0.20	mg/kg
Sulfur	2,079.05	mg/kg
Selenium	0.33	mg/kg
Zinc	29.34	mg/kg

Added vitamins

Content	Value	unit
Vitamin A	6,000	IU/kg
Vitamin D3	1,500	IU/kg
Vitamin E	69	mg/kg
Vitamin K3	1	mg/kg
Vitamin B1	20	mg/kg
Vitamin B2	10	mg/kg
Vitamin B6	14	mg/kg
Vitamin B12	62	µg/kg
Nicotinic acid	50	mg/kg
Pantothenic acid	30	mg/kg
Folic acid	4	mg/kg
Biotin	401	µg/kg
Choline chloride	12	mg/kg

Amino acids

Content	Value	unit
Alanine	2,526	mg/kg
Arginine	10,118	mg/kg
Aspartic acid	3,632	mg/kg
Cystine	6,254	mg/kg
Glutamic acid	24,289	mg/kg
Glycine	3,200	mg/kg
Histidine	5,428	mg/kg
Isoleucine	7,432	mg/kg
Leucine	15,141	mg/kg
Lysine	17,976	mg/kg
Methionine	7,453	mg/kg
Phenylalanine	7,367	mg/kg
Proline	13,104	mg/kg
Serine	5,393	mg/kg
Threonine	7,362	mg/kg
Tryptophan	2,039	mg/kg
Tyrosine	9,561	mg/kg
Valine	3,358	mg/kg

Fatty acid

Content	Value	unit
Arachidic acid C-20:0	823	mg/kg
Eicosanoic acid C-20:1	1,097	mg/kg
Alpha-Linolenic acid C-18:3	2,468	mg/kg
Linolenic acid C-18:2	49,993	mg/kg
Palmitic acid C-16:0	11,150	mg/kg
Stearic acid C-18:0	2,193	mg/kg
Oleic acid C-18:1	21,112	mg/kg

МЕДИЧНІ
НАУКИ

ПРАЦІ НАУКОВОГО ТОВАРИСТВА
ІМ. ШЕВЧЕНКА

Зареєструватися Увійти

Поточний випуск

Архів

Редколегія

Для авторів

Рецензування

Політика журналу

Контакти

In Memoriam

Пошук

Home / Архіви / Том 55 № 1 (2019); Праці Наукового товариства імені Шевченка. Медичні науки

Том 55 № 1 (2019): Праці Наукового товариства імені Шевченка. Медичні науки



ISSN: 1563-3950
 DOI: <https://doi.org/10.25040/ntsh2019.01>
 Періодичність: 2 рази на рік
 Мова видання: українська, англійська

Позаклітинні нейтрофільні кастки. Візуалізація рівня деконденсації ДНК за аналізом фарбування пропідію йодидом. Ростислав Білий, Галина Біла (С) 2019

Опубліковано: 2019-06-24

Весь випуск

- [FULL ISSUE PDF](#)

Огляд

ЗАХВОРЮВАННЯ ПАРОДОНТУ ТА АНОМАЛІЇ І ДЕФОРМАЦІЇ ЗУБОЩЕЛПНОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ РІЗНОГО ВІКУ (СТАН ПРОБЛЕМИ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ВИРІШЕННЯ)

О. Годований, А. Мартовлос, О. Годована 10-30
 DOI: <https://doi.org/10.25040/ntsh2019.01.02>
 Переглядів анотації: 921 | Завантажень PDF: 282 Завантажень PDF: 0

[ARTICLE PDF](#)
[ARTICLE HTML](#)




ISSN 2708-8634

ISSN 2708-8642



CiteScoreTracker 2022: **0.8**

Proceedings of the Shevchenko Scientific...

Q4

Molecular Medicine

best quartile

SJR 2022

0.13

powered by scimagojr.com



DOI-prefix: 10.25040

Архів журналу по роках







НАУКОВЕ ТОВАРИСТВО ІМЕНІ ШЕВЧЕНКА
У Львівській лікарській комісії

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНІ НАУКИ