

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента кандидата біологічних наук Козак Марії Романівни, старшого наукового співробітника лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН, на дисертаційну роботу Білої Галини Ігорівни на тему «Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок» на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія», що подана в разову спеціалізовану вчену раду ДФ 35.368.004 Інституту біології тварин НААН

1. Актуальність теми дисертаційного дослідження.

Нейтрофіли – це вроджені імунні фагоцити, які відіграють центральну роль в імунному захисті. За останні роки завдяки новим дослідженням поглибилося розуміння ролі нейтрофілів у виведенні патогенів, регуляції імунітету та патології захворювання. Павутинні структури хроматину, відомі як нейтрофільні позаклітинні пастки (НПП), є основною причиною відновлення зацікавленості до біології нейтрофілів. Ідентифікація сполук, які модулюють вивільнення НПП, сприяє уточненню уявлень про роль НПП в імунному захисті, запальних, аутоімунних захворюваннях і онкології.

У дисертації Білої Г.І. доведено вплив НПП на ушкодження тканин гепатобіліарної системи та розвиток системного запалення внаслідок дії ендогенних наночастинок, які утворилися у мишей і щурів за високоліпідної високохолестеринової (ВЛВХД) та високофруктозної (ВФД) дієт. Біла Г.І. дослідила і запропонувала інгібітори для блокування запальних процесів, спричинених НПП внаслідок дії ендогенних і екзогенних частинок. Запропонований підхід виявився ефективним у зменшенні запалення.

Проведені Білою Г.І. дослідження фармакологічних препаратів та інших речовин, які впливають на утворення НПП, дають можливість формування лікувальної стратегії для зниження запальної реакції організму. Водночас, дослідження ад'ювантних властивостей наночастинок для створення вакцин є актуальними у боротьбі з новими інфекціями і дають розуміння ролі НПП в імунному захисті організмів.

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

Дисертаційна робота виконувалась у лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН та на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького в межах науково-дослідних програм за завданнями «Вивчити біохімічні механізми формування та регуляції клітинного компартменту і гуморального імунітету у тварин за норми і патології» (Державний реєстраційний номер –

0116U001415) та «Використання позаклітинних нейтрофільних пасток для модулювання запальних процесів» (Державний реєстраційний номер – 0119U101338). Дана робота була підтримана міжнародними грантами Асоціації RECOOP HST (Activation of neutrophils by natural body nanocrystals as a common disease mechanism underlying nutrition-related low-grade inflammation), фундації Фольксваген (The importance of neutrophil-derived enzymes for the processing of auto-antigens and inflammatory mediators), Horizon2020 – FETOPEN проекту NeutroCure (Development of «smart» amplifiers of reactive oxygen species specific to aberrant polymorphonuclear neutrophils for treatment of inflammatory and autoimmune diseases, cancer and myeloablation) та Європейської федерації імунологічних товариств для участі в конгресі ECI-2021.

3. Ступінь обґрунтування основних положень і висновків сформульованих у дисертації, їх достовірність.

Дисертаційна робота виконана на високому методичному рівні. У роботі застосовано гістологічні, біохімічні, імунологічні та статистичні методи аналізу. Для досліджень використано нові та існуючі тваринні моделі. Автор обґрунтовано виконує дослідження на тваринах (щурах), які не мають жовчного міхура і доводить, що утворення каменів у великих жовчних протоках не є причиною ушкодження тканин печінки. Вважаю, що вибір методів та моделей дослідження є повністю обґрунтованим. Обрані методи є сучасними, інформативними та повністю достатніми для досягнення поставленої мети та визначених завдань. Результати досліджень проілюстровано якісними фотографіями та рисунками зі статистично опрацьованими даними, що підтверджує обґрунтованість та достовірність основних положень і висновків сформульованих у дисертації та полегшує сприйняття матеріалу. Аналіз та обговорення отриманих результатів дозволили дисертантці сформулювати основні положення та висновки, які відповідають змісту роботи і отриманим результатам.

4. Наукова новизна досліджень та отриманих результатів.

Дисертаційна робота Білої Г.І. містить нові обґрунтовані результати. Зокрема, для проведення досліджень було створено і застосовано нову модель неалкогольного стеатогепатиту у лабораторних мишей лінії C57BL6/N за дії ВЛВХД та ВФД. За допомогою розробленої моделі досліджено інфільтрацію лейкоцитів, руйнування судин, ушкодження жовчних проток. Така модель дозволила вивчити роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку патології. Крім цього, під час проведення цих досліджень було розроблено метод розпізнавання (автор вводить термін дискримінації) еозинофілів у гістологічних зразках, що дозволяє виокремити нейтрофільні та еозинофільні гранулоцити у тканинах

печінки. Біла Г.І. застосувала флуоресцентну та поляризаційну мікроскопії для дослідження мікрокристалів холестеролу у жовчному міхурі і виявила, що вони були оточені НПП. Утворення НПП навколо ендogenous кристалів холестеролу у жовчних міхурах та одночасне зростання активності еластази нейтрофілів у сироватці крові тварин за досліджуваних дієт спонукали Білу Г.І. дослідити процеси формування НПП. За допомогою прижиттєвої діагностики активності еластази нейтрофілів у тілі живих тварин вперше виявлено системний характер запального процесу, спричинений зазначеними ВЛВХД та ВФД.

Біла Г.І. вперше припускає, що активація нейтрофільних гранулоцитів та утворення НПП спричиняють запалення дрібних міжклітинних жовчних проток.

Біла Г.І. запропонувала підходи до усунення патологічної дії НПП на організм. Було проведено експерименти з використанням різних речовин (антинейтрофільних антитіл, гепарину (фраксипарину), метопрололу та гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (gCSF)) для зниження/профілактики запальної реакції у мишей.

На наступному етапі досліджень автор дослідила можливість використання екзогенних наночастинок для керованого утворення НПП і стимулювання імунної відповіді для розробки вакцин. Біла Г.І. вперше довела можливість застосування наночастинок як ад'ювантів для розвитку імунного захисту від коронавірусів, використовуючи пептид із ділянки HR2 Spike-білка.

5. Теоретичне та практичне значення роботи й впровадження отриманих результатів.

Результати дисертаційної роботи Білої Г.І. розширюють та доповнюють існуючі напрацювання науковців із обраної теми щодо розуміння ролі НПП у регуляції імунітету та патології запальних процесів.

Розроблено нову модель неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) у мишей, що має особливе значення для пошуку ліків і профілактики даного захворювання. Розроблено метод «дискримінації еозинофільних гранулоцитів та нейтрофільних гранулоцитів», який було використано для визначення участі еозинофільних гранулоцитів у розвитку алергії до коров'ячого молока у дітей. Розроблено неінвазивний спосіб оцінки ефективності роботи гепатобіліарної системи *in vivo* у тварин.

Теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи Білої Г.І. впроваджені в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Вроцлавському університеті науки і техніки, Тернопільському національному медичному університеті імені І.Я. Горбачевського та ВП «Лікарня святого Миколая».

6. Повнота викладу матеріалу дисертації в опублікованих працях.

Результати досліджень опубліковані у 29 наукових публікаціях, з яких 10 статей у наукових фахових виданнях (1 стаття у розділі монографії, 6 у виданнях, що входять до наукометричних баз Web of Science і Scopus, 5 з яких у виданнях Q1 і Q2), 1 препринт, 17 доповідей у матеріалах наукових конференцій). Усі наукові праці повністю відображають результати й основні положення дисертації Білої Г.І. Матеріали дисертаційної роботи оприлюднено й обговорено на достатній кількості наукових конференцій.

7. Обсяг та структура роботи, оцінка змісту дисертації та її завершеність.

Дисертація містить усі розділи, передбачені вимогами до оформлення дисертації згідно з Наказом МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» від 12.01.2017 року № 40, а також у відповідності з Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44.

Дисертація складається з анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел інформації та додатків. Загальний обсяг дисертації 232 сторінки, основна частина її складає 165 сторінок.

В анотації сформульовано мету дисертаційної роботи, узагальнено отримані результати наукових досліджень, наведено ключові слова та подано список опублікованих праць за темою дисертації.

У вступі обґрунтовано актуальність обраної тематики, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами та грантами, подано мету роботи та завдання дослідження, перелічено методи досліджень, описано наукову новизну, практичне значення та впровадження отриманих результатів, висвітлено особистий внесок здобувача і апробацію результатів дисертації.

У першому розділі дисертації викладено огляд літератури, розглянуто НПП та їх роль у розвитку запальних процесів, участь в імобілізації мікрооб'єктів. Також розглянуто патології шлунково-кишкового тракту (неалкогольну жирову хворобу печінки, хвороби спричинені жовчаними каменями, роль фруктози у запальних процесах) та їх взаємозв'язок з НПП.

У другому розділі подано застосовані у дисертаційній роботі експериментальні методи. Також описано серії експериментів та схеми досліджень. Охарактеризовано тваринні моделі застосовані у дослідженнях. Усі маніпуляції з тваринами виконано відповідно до законодавства і дозволів біотичних експертиз.

У третьому розділі наведено результати власних досліджень та їх обговорення. У підрозділі 3.1 описано вплив ендогенних частинок на утворення НПП і виникнення запальної реакції у тварин. Охарактеризовано результати досліджень з використанням описаних у другому розділі тваринних моделей.

Зокрема, проаналізовано патофізіологічні стани у тварин, зміни їхньої поведінки, зміни основних біохімічних показників сечі та маси тіла. Детально вивчено патофізіологічні зміни печінки за ВЛВХД та ВФД. Також досліджено масштаби впливу НПП на організм тварин за активністю еластази нейтрофілів. Окремо слід відзначити дослідження описані у цьому розділі, які стосуються можливості впливу на формування НПП фармакологічними препаратами та проліками для зниження запальної реакції. Авторка проаналізувала ефективність застосування антинейтрофільних антитіл, фраксипарину, метопрололу, гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора та іонів натрію для зниження формування НПП. У підрозділі 3.2 описано застосування НПП для керованого посилення імунної відповіді. Зокрема, показано вплив наночастинок (нановолокна оксиду алюмінію $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, графен оксиду і нанодіамантів) на формування НПП на моделі повітряної кишені у мишей. Описано пошук крос-реактивних антигенів коронавірусів для дослідження участі НПП у формуванні специфічної імунної відповіді. Вивчено тривалість імунітету у тварин після імунізації наночастинками, що індукують утворення НПП.

У четвертому розділі наведено аналіз та узагальнення результатів дослідження. Автор порівнює власні результати щодо ролі ендогенних наночастинок в активації нейтрофільних гранулоцитів з даними інших науковців. Зокрема, описує важливість вибору наночастинок за їхнім розміром, що має істотне значення за впливом на мембрани клітин. Описує можливості застосування керованого утворення НПП за допомогою екзогенних наночастинок для посилення імунної реакції. Біла Г.І. переконливо доводить висунуту нею гіпотезу про участь НПП в ушкодженні тканин печінки, що може спричинити системну запальну реакцію.

Висновки дисертації сформульовані на основі одержаних результатів.

8. Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності.

У дисертації та наукових публікаціях Білої Г.І. відсутні порушення академічної доброчесності.

9. Зауваження і побажання щодо змісту та оформлення дисертації.

1. У дисертації наведено скорочення еластази нейтрофілів (NE), якого автор часто не дотримується.

2. У розділі 2.3.2. *Модель індукції імунної відповіді (клітинної та гуморальної) у лабораторних тварин* не зрозуміло, яке дозування антигену і

ад'юванта було з розрахунку на тварину. Чи внутрішньоочеревинна та підшкірна імунізацію включали однакові об'єми/доза введенних речовин?

3. Чи для всіх типів досліджуваних ад'ювантів використовували однакове дозування?

4. На рис. 3.71 є позначення А і Б, пояснення яких відсутнє у підписі до даного рисунка.

5. Неконтрольована або надмірна продукція НПІ може викликати загострення запалення та розвитку аутоімунної відповіді. Тоді застосування нанодіамантів з метою імунізації також може стати причиною аутоімунного захворювання. Як можна уникнути такого наслідку?

6. У розділі матеріали і методи варто було б навести метод визначення розмірів досліджуваних наночастинок.

Наведені недоліки не впливають на позитивну оцінку дисертації Білої Г.І., мають переважно рекомендаційний характер і можуть бути предметом майбутніх досліджень.

10. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Білої Галини Ігорівни «Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок» за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, практичним значенням одержаних досліджень та висновків відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44, а її автор, Біла Галина Ігорівна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія».

Рецензент:

старший науковий співробітник
лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії
Інституту біології тварин НААН,
кандидат біологічних наук



Козак М.Р.

Підпис к.б.н Козак М. Р. засвідчую
Вчений секретар Інституту біології
тварин НААН, к.с.-г.н., с.н.с.

Смолянїнова О.О.