

## ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, проректора з наукової роботи, професора кафедри функціональної і лабораторної діагностики Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України Кліща Івана Миколайовича на дисертаційну роботу Білої Галини Ігорівни на тему: «Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок», представлену до захисту в разову спеціалізовану вчену раду ДФ 35.368.004, створену відповідно до наказу Інституту біології тварин НААН № 37-к від 26 червня 2023 року з правом прийняття до розгляду та проведення разового захисту дисертаційної роботи на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

**Актуальність обраної теми.** Широке використання мікро- та наночастинок у медицині та біотехнології вимагає розробки нових підходів до оцінки взаємодії цих частинок з тканинами організму. Як вказують ряд дослідників, макрофагальна система організму здатна поглинати деякі кристали та наночастинок з їх наступним окисненням чи перетравленням у кислому середовищі лізосом. Проте у випадку інертних, гідрофобних чи надто великих частинок, частинок з гострими краями тощо такий механізм неефективний і єдиним шляхом забезпечення їх безпечного перебування в організмі є ізоляція чи секвестрування, зокрема, шляхом оточення позаклітинними нейтрофільними пастками.

Рядом авторів було показано, що наночастинок певних розмірів призводять до ушкодження мембрани нейтрофілів, що запускає механізм утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (НПП) і підсилює відповідь імунної системи на одночасно введені антигени. Очевидно, що крім утворення НПП у відповідь на дію бактерій, грибів, деяких вірусів, у нейтрофілів існує механізм активації утворення НПП у відповідь на неспецифічні ушкодження плазматичної мембрани нано- і мікрочастинками. НПП ефективно ізолюють сторонні тіла та оточують ділянки запалення.

Механізм дії НПП полягає у захопленні сторонніх часток деконденсованою ДНК і гістонами, декорованими компонентами нейтрофільних гранул, які виявляють токсичну дію (через утворення активних форм кисню та інших сполук).

У роботах ряду дослідників було показано, що ендогенні наночастинки (НЧ), а саме кристали холестеролу в просвітах жовчного міхура можуть активувати нейтрофіли та ініціювати утворення НПП, що в результаті призводить до їх агрегації та формування каменів та ушкодження тканини печінки. Утворення НПП також є результатом відповіді на солі моноурату натрію при подагрі. Водночас інші НЧ екзогенного походження – ті, що вдихаються з пилом, поглинаються з їжею, а також вводяться з фармацевтичними препаратами, наприклад, інертні НЧ як ад'юванти вакцин, можуть мати подібний вплив на індукцію утворення НПП.

Зважаючи на вище наведене, сформульовані дисертанткою мета. А саме визначення ролі нейтрофільних гранулоцитів у розвитку запальних процесів при взаємодії організму з наночастинками, зокрема ендогенними НЧ, які утворюються за літогенних дієт (із високим вмістом холестеролу 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, а також завдання дослідження є актуальними і важливими як в теоретичному плані, так і з точки зору подальшого практичного застосування отриманих результатів.

#### **Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими програмами.**

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.

**Наукова новизна та достовірність одержаних результатів.** Дисертанткою у результаті проведених досліджень вперше доведено вплив ендогенних НЧ за дії літогенних дієт, спричинених високим вмістом фруктози та холестеролу, 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. З використанням моделі тварин, позбавлених жовчного міхура, доведено, що ушкодження тканин печінки за високохолестеролової дієти не залежить від наявності жовчного міхура чи оклюзії основних вивідних жовчних проток, тобто ушкодження печінки є результатом оклюзії дрібних збірних жовчних каналців.

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.

Виявлені закономірності щодо ушкодження клітин печінки НПП, а також описані шляхи їх запобіганню з використанням доступних фармакологічних препаратів, що впливають на НПП, відкривають нові шляхи розвитку терапії при неалкогольній жировій хворобі печінки.

**Практична цінність одержаних результатів.** В ході виконання завдань роботи вперше було створено модель неалкогольного стеатогепатиту 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 неалкогольної жирової хвороби печінки 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 глікозилування 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 спільноті кількісний малоінвазивний підхід (аналіз зразків сироватки крові) до моніторингу ушкоджень тканин печінки у створеній моделі неалкогольної жирової хвороби печінки.

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 (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 індоціаніну зеленого за швидкістю переходу 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.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі.** Усі узагальнення та висновки, наведені у дисертаційній роботі, ґрунтуються на матеріалах власних досліджень і відображають закономірності, що були виявлені шляхом аналізу отриманих авторських результатів. Робота виконана на високому методичному рівні із застосуванням сучасних методів досліджень, які є адекватними до поставленої мети та визначених завдань. Усі отримані результати опрацьовані статистично за допомогою відповідних методів математичної статистики. Ретельний аналіз отриманих результатів дав змогу дисертантці їх узагальнити та зробити висновки. Усі висновки відповідають змісту роботи.

**Аналіз дисертаційної роботи.** 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.

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

У *анотації* детально викладені основні результати наукових досліджень, які отримані при виконанні дисертаційної роботи, а також подано власні публікації.

У *вступі* наведено актуальність обраної дисертанткою теми, мету і завдання роботи, наукову новизну, теоретичне та практичне значення одержаних результатів, особистий внесок здобувача у виконанні

дисертаційної роботи, відображена апробація результатів роботи, основні положення дисертації та показані методи вирішення поставленої проблеми.

*Розділ «Огляд літератури»* включає 3 підрозділи, у яких автор приводить і узагальнює дані в основному іноземної та декількох джерел вітчизняної літератури. Зокрема, охарактеризовано роль позаклітинних нейтрофільних пасток у розвитку запальних процесів та їх участь в імобілізації мікрооб'єктів. У окремому підрозділі охарактеризовано патологічні процеси шлунково-кишкового тракту, в яких задіяні НПП, зокрема неалкогольна жирова хвороба печінки. У цьому підрозділі проаналізовано також природні наночастинки у шлунково-кишковому тракті, роль фруктози у патології розвитку запальних процесів, можлива участь позаклітинних нейтрофільних пасток у запальних процесах шлунково-кишкового тракту.

*Розділ «Матеріали і методи дослідження»* характеризує серії досліджень, об'єкти та передумови, напрями, схему, матеріал, обладнання та методи досліджень. Дослідження проведені на достатній кількості експериментального матеріалу. Використані методи досліджень проводились на сучасному обладнанні, мають високий науковий та методичний рівень, відповідають меті та завданням роботи. Статистична обробка матеріалів проводилась з використанням сучасного програмного забезпечення, зроблена коректно і доказово.

У розділі 3 *«Результати дослідження та їх обговорення»*, що складається з 2-ох підрозділів, дисертантка детально представила та проаналізувала отримані експериментальні результати.

Зокрема, у підрозділі 3.1 наведено результати впливу ендогенних наночастинок в гепатобіліарній системі на процеси активації нейтрофільних гранулоцитів та індукції запальної реакції. Детально охарактеризовано тваринні моделі для дослідження неалкогольної жирової хвороби печінки, розглянуто патофізіологічні зміни в організмі тварин за умов високоліпідної високохолестеролової та високофруктозної дієт (динаміка маси тіла, поведінкові зміни, споживання їжі, зміни основних біохімічних показників сечі), представлено дослідження патологічних змін в печінці та утворення

НПП у гепатобіліарній системі на тлі впливу високоліпідної високохолестеролової та високофруктозної дієт, показники, що характеризують системні запальні реакції при впливі високоліпідної високохолестеролової дієти (зокрема зміни циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові, глікозилювання молекул IgG у сироватці крові, активність еластази нейтрофілів у крові, порушення екскреторних функцій гепатобіліарної системи). Окремо розглянуто стратегії запобігання ушкодженню тканин гепатобіліарної системи при ВЛВХД, зокрема усунення нейтрофільних гранулоцитів за допомогою моноклональних антитіл та вплив на гепатобіліарну систему, запобігання ушкодженню тканин печінки шляхом керованого впливу на утворення НПП за допомогою фармакологічно доступних сполук.

У підрозділі 3.2 наведено результати використання НПП для керованого посилення імунної відповіді. Дисертантка детально охарактеризувала використання моделі повітряної кишені для дослідження формування НПП за дії наночастинок та утворення імунної відповіді на рекомбінантні антигени коронавірусів шляхом стимулювання утворення НПП. Тут, зокрема, показано як здійснювався пошук крос-реактивних антигенів коронавірусів, створення кон'югатів наночастинок із пан-коронавірусними антигенами, як відбувалась індукція утворення НПП за дії нанодіамантів. Охарактеризовано також параметри імунної відповіді на створену імуногенну суміш та довготривалі ефекти імунізації наночастинками, що індують утворення НПП.

У розділі 4 *«Аналіз та узагальнення результатів дослідження»* проведено глибокий, всебічний аналіз сучасної наукової літератури, зроблено порівняння з результатами власних досліджень. Цей розділ написаний лаконічно і професійно та характеризує дисертантку як підготовленого й високоерудованого науковця.

*Висновки* дисертації ґрунтуються на результатах експериментальних досліджень, містять цифровий матеріал.

**Відсутність (наявність) порушень академічного плагіату** За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертаційної роботи Білої



Галини Ігорівни на тему: «Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок», не було виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації та фальсифікації.

**Відповідність дисертації встановленим вимогам.** Робота виконана на належному методичному рівні та 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 № 44 від 12 січня 2022 року та Наказу МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 року.

**Повнота викладу основних положень дисертації в опублікованих працях.** Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 29 наукових праць, зокрема 1 праця у колективній монографії у співавторстві; 10 статей, із яких 6 – у міжнародних реферованих журналах, індексованих у Scopus і Web of Science (серед них 5 статей з імпакт-фактором) та 4 – у наукових фахових виданнях, затверджених МОН України; 1 препринт; 17 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій, конгресів, форумів, симпозіумів та інших наукових заходах, серед них 14 – міжнародних, зокрема 4 тез опубліковані в міжнародних реферованих журналах.

**Зауваження та запитання, які виникли при аналізі дисертаційної роботи.**

1. Не зовсім вдало сформульована назва роботи. Зокрема термін «участь» варто було замінити на «роль», «механізми впливу» тощо, позаяк цей термін не передбачає вивчення механізмів, що було зроблено у дисертації, а лише їх наявність чи відсутність. Окрім цього, не варто було конкретизувати увагу лише на тваринах (їх є також велике різноманіття), оскільки запальний процес є типовою реакцією організму (не лише тваринного).

2. Розділ 1 «Огляд літератури» мав би мати назву, яка б характеризувала спрямованість пошуку літературних джерел.

3. В кінці огляду літератури сформульована ще одна мета дослідження. Цього не варто було робити, адже мета сформульована у «Вступі». Доцільніше було зробити коротке резюме, де коротко підсумувати, що в літературі вже опубліковано з досліджуваної проблематики і які моменти залишаються не вивченими, що і стало предметом досліджень дисертантки.

4. У розділі 2 підрозділ 2.2 чомусь названо «Об'єкт дослідження». Це не зовсім коректно, адже в науковому світі під об'єктом дослідження розуміється якийсь процес або деяке явище, яке породжує проблемну ситуацію. Це явище і береться для проведення дослідження, а у цьому підрозділі дисертантка описує умови проведення дослідів та забір біологічного матеріалу для проведення досліджень.

5. У роботі подекуди дисертанткою використовуються застарілі терміни «окисний» замість «оксидативний», «холестерин» замість «холестерол» тощо.

У ході рецензування роботи виникли такі **запитання**:

1. У Ваших дослідженнях показано, що сформована НАЖХП через 6 тижнів трансформується у НАСГ. Які патогенетичні механізми задіяні в основі цієї трансформації і чи у цьому процесі індукування НПП є визначальним?

2. З якою метою Ви використали дві дієти – ВЛВХД і ВФД?

3. За яким алгоритмом Ви здійснювали пошук фармакологічних сполук, здатних блокувати утворення НПП та блокувати ушкодження тканин печінки, і чи є на Ваш погляд, інші сполуки, які можуть мати такі властивості?

4. Яка, на Ваш погляд, перспектива практичного використання інгібіторів формування НПП і яких з них?

5. Ви зафіксували, що високий вміст натрію у середовищі, що спостерігався при високосольовій дієті, також зменшував інтенсивність утворення НПП. Який, на Ваш погляд, механізм цього процесу?

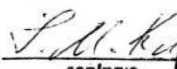
## ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Білої Галини Ігорівни на тему: «Участь нейтрофільних позаклітинних пасток у запальних процесах тварин за дії наночастинок» є закінченою науковою працею, що виконана автором на високому методичному рівні, достатньому об'ємі матеріалу, має наукову новизну, дослідження доповнюють ряд теоретичних положень і можуть бути використані на практиці, дисертація добре оформлена, написана грамотно, легко сприймається. Отримані результати є достовірними, на їх основі сформульовані висновки. Вважаю, що дисертаційна робота Білої Г.І. за формою, об'ємом та змістом відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її авторка заслуговує присудження їй наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» галузі знань 09 «Біологія».

### Офіційний опонент:

проректор з наукової роботи, професор  
кафедри функціональної і лабораторної  
діагностики Тернопільського національного  
медичного університету імені  
І.Я. Горбачевського МОЗ України,  
заслужений діяч науки і техніки України,  
доктор біологічних наук, професор

І.М. Кліщ

Особистий підпис   
завіряю  
Заступник ректора з кадрових питань  
Тернопільського національного  
медичного університету

