

Рецензія

офіційного рецензента кандидата біологічних наук Стефанишин Ольги Михайлівни, старшого наукового співробітника лабораторії фізіології, біохімії та живлення птиці 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.

Відомим є той факт, що віруси, бактерії, гриби та інші патогени індукують нейтрофільні позаклітинні пастки (НПП). НПП здійснюють функції із ізолювання окремих біологічних об'єктів, таких як окремі стафілококи та ділянки некрозу. 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, полістирену, азбесту, моноурату натрію, оксалату натрію. В деяких випадках взаємодія з такими частинками індукує вивільнення ендогенних протеаз, що специфічно розщеплюють протизапальні цитокіни, сприяючи стиханню запалення, як це показано для кристалів моноурату натрію при подагрі. Деякі дослідження показують, що наночастинки можуть спричиняти активацію нейтрофілів та сприяти формуванню НПП. Наприклад, наночастинки здатні стимулювати функціональну активність нейтрофілів, таку як продукція реактивних кисневих видів та виділення цитокінів, що сприяє утворенню НПП. З іншого боку, наночастинки також можуть впливати на саму структуру та функцію НПП. Деякі дослідження показують, що наночастинки можуть індукувати розчинення НПП та знижувати їх стійкість. Це може призводити до зменшення ефективності НПП у ловлі та знешкодженні мікроорганізмів. Враховуючи це, вплив наночастинок на участь НПП у запальних процесах тварин може бути двостороннім. Він може сприяти активації та формуванню НПП, але також може призводити до дестабілізації та зменшення їх функцій. Враховуючи цю складну динаміку, необхідні додаткові дослідження для кращого розуміння впливу наночастинок на НПП у контексті запальних процесів у тварин. Тому завдання перевірки ролі ендогенних наночастинок у гепатобіліарній системі із ушкодженням тканин печінки стало одним із основних завдань роботи.

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

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» (ДР №0116U001415), «Використання позаклітинних нейтрофільних пасток для модулювання запальних процесів» (ДР №0119U101338), «Activation of neutrophils by natural body nanocrystals as a common disease mechanism underlying nutrition-related low-grade inflammation» («Активізація нейтрофілів природними нанокристаломі 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.

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

Наукові положення, висновки та практичні рекомендації обґрунтовані належним чином. Для виконання поставлених завдань було проведено дослідження в декілька етапів. Згідно поставлених завдань дисертаційної роботи було проведено 14 серій досліджень, зокрема 9 серій досліджень для з'ясування ролі ендогенних наночастинок в індукції формування НПП та 5 серій досліджень для з'ясування ролі екзогенних наночастинок в індукції НПП.

В дисертації наведена достатня кількість таблиць, рисунків, що покращує сприйняття роботи, узагальнює фактичний матеріал і підтверджує, що отримані результати наукового дослідження вірогідні та обґрунтовані.

4. Наукова новизна досліджень та отриманих результатів.

Уперше дисертанткою показано вплив ендогенних наночастинок за дії літогенної дієти, спричиненої високим вмістом фруктози та холестерину, на

ушкодження тканин печінки за участі нейтрофільних гранулоцитів. Зокрема,

- показано зростання рівня активності еластази нейтрофілів у крові за дії літогенних дієт із високим вмістом холестерину та фруктози;
- виявлено нейтрофільні гранулоцити та нейтрофільні позаклітинні пастки 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 неалкогольною жировою хворобою печінки (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 за умов дії літогенних дієт. 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 за дії літогенних дієт. Вперше показано зростання імунної відповіді до синтетичних пептидів, зокрема пан-коронавірусних за дії екзогенних наночастинок, 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 наночастинами 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 наночастинок як ад'ювантів у ділянках інтраперитонеальних та підшкірних ін'єкцій утворюються НПП, що секвеструють наночастинок, 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 вказує на безпечність використання наночастинок як ад'ювантів. В критичний час розвитку пандемії коронавірусу, вперше в світі (22.08.2020 р.) 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. 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 наночастинок 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.

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

В ході виконання завдань роботи було вперше 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 цілий ряд 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. За допомогою розробленого методу показано участь еозинофільних гранулоцитів у розвитку алергії до коров'ячого молока у людини. 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) для 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) 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 наночастинок; 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 в 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 переходу із крові в жовч. Розроблений метод є повністю неінвазивним та дозволяє здійснювати оцінку стану гепатобіліарної системи лабораторних тварин.

6. Повнота викладу матеріалу дисертації в опублікованих працях.

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.

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

Рукопис роботи Білої Галини Ігорівни складено за загальноприйнятою схемою і вимогами до дисертацій. Дисертація містить усі розділи, передбачені вимогами до оформлення дисертації (Наказ 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). 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.

У *вступі* здобувач розкриває актуальність обраної теми дослідження, чітко сформульована мета і завдання дослідження, показані наукова новизна, теоретична і практична значимість отриманих результатів, особистий внесок здобувача.

В *огляді літератури* проаналізовані дані з наукових джерел, які висвітлюють роль позаклітинних нейтрофільних пасток у розвитку запальних процесів, їхню участь в іммобілізації мікрооб'єктів та патології шлунково-

кишкового тракту, в яких задіяні НПП, основні використання нанотехнологій для створення нових антибактеріальних препаратів, функціональний стан організму за їх введення.

У розділі 2 «Матеріали та методи досліджень» автор подає об'єкти і передумови досліджень, схему досліджень та опис комплексу застосованих сучасних методик – 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. Планування дослідів здійснювали згідно з принципом 3R щодо зменшення використання лабораторних тварин та принципів гуманного поводження з ними.

Розділ 3 дисертантка присвятила дослідженню впливу ендогенних наночастинок 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). У цьому підрозділі описано фізіологічні зміни тварин за станів, асоційованих із утворенням НПП та визначено роль НПП у розвитку системного запального процесу. У роботі визначали динаміку ушкодження тканин печінки та фізіологічних змін, досліджували можливі причини, задіяні у розвитку стеатогепатиту у лабораторних мишей лінії C57BL6/N. При цьому здійснено пошук безпечних екзогенних наночастинок, 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).

В розділі 4 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» наведено аналіз проведених результатів досліджень та співставлення їх з даними літератури.

За результатами роботи зроблено 8 висновків, які відповідають отриманим результатам.

Список використаної літератури оформлено згідно з існуючими вимогами із чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань.

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

При рецензуванні дисертаційної роботи не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації, текстових запозичень чи інших порушень. Усі ідеї та положення, викладені у дисертаційній роботі, належить автору.

9. Зауваження і побажання щодо змісту та оформлення дисертації.

Не зважаючи на усі позитивні моменти дисертаційної роботи Білої Г.І., проте є деякі зауваження та побажання і після аналізу роботи виникли деякі дискусійні питання, на які варто почути відповідь дисертантки:

1. Перелік умовних позначень слід було подавати українською аббревіатурою усі скорочення.
2. Дисертаційна робота насичена рисунками і фото, проте деякі показники краще було інтерпретувати у цифровому вигляді.
3. Які морфологічні зміни у тварин ви помітили при двох моделях дієт?
4. Як був створений специфічний пептидний субстрат із флуорогеном?
5. Чому у дослідженнях для запобігання агрегації НПП зупинилися на фраксипарині, а для запобігання екстравазації – на метопрололі?
6. Як ви поясните зростання активності еластази нейтрофілів у двох моделях дієт на 6 тиждень у крові тварин? Чому не були виявлені такі зміни на 4 тиждень експерименту?

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Білої Галини Ігорівни «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», 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 ступення доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44, а її автор, Біла Галина Ігорівна, заслуговує на присудження ступення доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія».

Рецензент:

старший науковий співробітник
лабораторії фізіології, біохімії та
живлення птиці Інституту біології
тварин НААН, к.б.н, с.н.с.



О.М. Стефанишин

Підпис к.б.н., с.н.с. Стефанишин О.М. завіряю
Вчений секретар Інституту біології
тварин НААН, к.с.-г.н., с.н.с.

О.О. Смолянінова