

## **ВІДЗИВ**

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Топол Інни Олександрівни** «Функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори», подану в спеціалізовану вчену раду Д. 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

**Актуальність обраної теми.** Впродовж століть хронічний стрес є незмінним супутником життя людини, який, незалежно від статі, віку, посади, рівня доходу й інтелектуального розвитку індивідуума впливає на формування стану здоров'я цілого населення будь-якої країни. Здатність організму протистояти різного роду несприятливим впливам навколишнього середовища і патогенним організмам, які знаходяться в ній, значно знижується в умовах постійного психологічного напруження і дискомфорту. На фоні хронічного соціального стресу, соціально-економічної нестабільності в Україні протягом останніх десятиріч спостерігається значне підвищення багатьох патологічних станів, включаючи цукровий діабет 1 типу, запальні захворювання кишківнику, інфекції, пухлини. Незважаючи на значне число наукових публікацій по даній проблемі, ще багато питань залишаються невирішеними, особливо в плані впливу хронічного соціального стресу на функціонування вродженого та адаптивного ланок імунітету в кишково-асоційованої лімфоїдної тканини, і це є головним напрямком даного дослідження. Тому з'ясування механізмів, які лежать в основі викликаних стресом захворювань свідчать про медичну й соціальну значущість проблеми, а перспективність її вивчення, обумовлює важливість дослідження і робить роботу Топол І.О. необхідною, своєчасною та актуальною.

**Новизна дослідження і отриманих результатів.** Наукова новизна дослідження безпосередньо витікає з отриманих у роботі оригінальних результатів. Автором розроблені нові сучасні способи наукових досліджень, що оформлено у вигляді патентів України «Спосіб ідентифікації Т-хелперів 17 типу (Th17)», «Спосіб ідентифікації CD25+Foxp3+ регуляторних Т-клітин (Treg) у гістологічних зрізах» та «Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин». Завдяки цьому вдалось отримати принципово нові дані, а саме показано, що розвиток хронічного соціального стресу призводить до змін розподілу TLR2<sup>+</sup>/TLR4<sup>+</sup> - і Nf-kB<sup>+</sup>-лімфоцитів, дисбалансу Th1/Th2 і T<sub>reg</sub>/Th17-клітин, змін загальної кількості LMP2<sup>+</sup>- і XBP1<sup>+</sup>-лімфоцитів, зниження рівня експресії мРНК Nr3c1- та Adrb2-рецепторів, а також збільшення транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів і Nlrp3-інфламасоми. Автором дисертаційного дослідження експериментально обґрунтовано необхідність обережного ставлення до модуляції складу кишкової мікрофлори за допомогою антибіотиків та пробіотиків за умов стресу через вірогідність посилення рівня прозапальної сигналізації, та, відповідно, ймовірності розвитку запальних та аутоімунних захворювань кишечника. Таким чином, у роботи вперше встановлені певні імунні механізми активації прозапальної сигналізації в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині в умовах хронічного соціального стресу.

**Теоретичне значення результатів дослідження.** У дисертації наведено теоретичне узагальнення, яке має вагоме значення для вирішення актуальної наукової задачі сучасної патофізіології та імунології щодо оцінки впливу хронічного соціального стресу на функціонування вроджених та адаптивних компонентів імунітету на основі встановлення нових механізмів, які пояснюють превалювання прозапальної сигналізації в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині. У дисертації експериментально обґрунтована узагальнююча схема, що висвітлює імунні механізми хронічного соціального стресу – активація вроджених компонентів імунної

системи TLR2<sup>+</sup>/TLR4<sup>+</sup> - і Nf-kB<sup>+</sup>-лімфоцитів зі зростанням транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів та Nlrp3-інфламасоми; домінування Th1- і Th17-лімфоцитів; зменшення кількості CD25<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup> - і CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів, що може сприяти втраті ауто толерантності; зміна рівню процесингу антигенів та генерації імунодомінантних епітопів внаслідок імунопротеасомного дефекту; порушення відповіді на не згорнуті білки, що сприяє їх накопиченню та знижує ефективність їх деградації; зміни чутливості клітин-мішеней до глюкокортикоїдів та катехоламінів через зниження рівня експресії мРНК їх рецепторів. Отже результати дослідження розширюють теоретичні фундаментальні знання про фактори ризику та механізми розвитку запальних та аутоімунних захворювань кишечника.

**Практичне значення результатів дослідження.** Практичне значення одержаних результатів, полягає в тому, що автором поглиблені уявлення про механізми розвитку імунних порушень в умовах хронічного соціального стресу та при модуляції складу кишкової мікрофлори як можливих факторів ризику виникнення аутоімунних і прозапальних процесів. Ці данні можуть мати медичне та соціально-економічне значення, тому що зможуть надати наукове підґрунтя розробки нових підходів до корекції стану імунної системи у пацієнтів з хронічними запальними захворюваннями кишечника, зокрема «синдрому подразненого кишечника».

Дисертанткою, спільно із співавторами, були оновлені, доповнені та впроваджену у практику низки наукових лабораторій методи ідентифікації в гістологічних зрізах Th17-клітин і CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Т-регуляторних лімфоцитів, розроблений спосіб виділення РНК з парафінових блоків, що розширює сучасний рівень імуногістохімічних та молекулярно-генетичних досліджень.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені в наукову роботу та навчальний процес кафедр патофізіології Дніпропетровської медичної академії МОЗ України, ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет», Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»,

Харківського національного медичного університету, кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології медичного інституту Сумського державного університету.

**Ступінь обґрунтованості і достовірності наукових досліджень і висновків, які сформульовані в дисертації.**

Дисертація Топол Інни Олександрівни виконана на сучасному, доказовому науково-методичному рівні. Для вирішення наукових завдань здобувачем використано комплекс сучасних методів імуногістохімічних, імунофлюоресцентних, молекулярно-генетичних досліджень та методів математичної статистики. Усі наукові положення, висновки роботи є достовірними, логічними, науково обґрунтованими і в закономірній послідовності витікають із результатів основного змісту роботи, ґрунтуються на фактичному матеріалі, отриманому на достатній кількості досліджень, проведених на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів та даних їх морфометричних і денситометричних характеристик у 140 самок щурів. Загальний дизайн дослідження, адекватний набір експериментальних та контрольних груп, підбір методик є сучасними, відповідають поставленій меті і завданням дослідження та повністю дозволяють їх реалізації.

Дисертантом проведений глибокий пошук і аналіз наукової літератури за темою дисертаційного дослідження. Усі результати досліджень отримані з використанням класичних методів статистичного аналізу та наведені у вигляді таблиць в розділах власних досліджень. Аналіз та узагальнення результатів досліджень проведений ретельно, з посиланням на дані як вітчизняних, так і закордонних дослідників, які отримані з опрацьованих автором джерел наукової літератури.

Таким чином, ступінь обґрунтованості положень та висновків, сформульованих в дисертаційному дослідженні є достатнім.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом планової наукової роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету

«Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології» (державний реєстраційний номер 0112U005642). Дисертант є співвиконавцем теми.

**Повнота викладення наукових положень, висновків та рекомендацій в опублікованих працях.** За темою дисертації опубліковано 40 наукових праць, з них 12 статей у виданнях іноземних держав та у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз, у т.ч. наукометричної бази Scopus, оформлено 3 патенти на корисну модель, 25 тез у матеріалах конгресів, з'їздів, симпозіумів та наукових конференцій. Обсяг друкованих робіт та їх кількість повністю відповідають вимогам ДАК МОН України щодо публікації основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних наук. Основні положення дисертації знайшли ґрунтовне і логічне відображення в авторефераті, який повністю відповідає змісту дисертації, матеріали дисертації повністю оприлюднені у наукових працях здобувача.

**Відповідність дисертації вимогам ДАК МОН України.** Дисертаційна робота Топол І.О. побудована згідно вимог ДАК МОН України і викладена на 213 сторінках, складається зі вступу, опису матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел з 310 найменувань. Дисертація ілюстрована 44 таблицями і 25 рисунками.

#### **Загальна характеристика роботи.**

У **вступі** до дисертації автором визначена актуальність обраної теми, показана загальна характеристика проблеми впливу хронічного соціального стресу на функціонування ланок вродженого та адаптивного імунітету і встановлення певних імунних механізмів активації прозапальної сигналізації в КАЛТ, чітко сформульовано мету, завдання дослідження. Визначені об'єкт, предмет і методи дослідження, викладені наукова новизна та практичне



значення отриманих результатів, наведені дані про особистий внесок здобувача, публікації та апробацію основних результатів роботи.

У першому розділі роботи **«Сучасні уявлення про функціональний стан вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ в нормі і при патології»** (огляді літератури), який викладено на 29 сторінках, що не перевищує 20% обсягу основної частини тексту дисертації, автором проведено аналіз основних сучасних літературних даних про морфо-функціональний стан вроджених і адаптивних компонентів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини, участь її клітинних субпопуляцій у фізіологічних і патологічних процесах. Показано, що події, які відбуваються в КАЛТ в умовах хронічного стресу, можуть викликати активацію деяких ланок імунної системи та взагалі характеризуються низкою особливостей, які не узгоджуються із застарілими уявленнями про тотальну імунодепресію за умов стресу. Важливим набутком огляду є обґрунтування того, що відтворення хронічного соціального стресу є одним з найбільш перспективних експериментальних підходів для вивчення механізмів, які лежать в основі стрес-індукованих захворювань, у тому числі й запальних захворювань кишечника. Усе вищезазначене стало підставою даного дослідження, визначило його характер, мету і основні завдання.

Загалом матеріал цього розділу свідчить про зрілість дисертанта як наукового дослідника, значний об'єм проведеної роботи із літературними джерелами, досконале вміння працювати з сучасними інформаційними системами. Джерела цитуються доречно і обґрунтовано, літературні посилання оформлені згідно до існуючих вимог.

Другий розділ **«Матеріали та методи дослідження»** традиційно присвячений опису об'єктів дослідження, матеріалів і методів, які було застосовано для реалізації завдань дослідження, та складається з п'яти підрозділів. Автором докладно описано методики моделювання застосованих експериментальних моделей хронічного соціального стресу шляхом трьохтижневої соціальної ізоляції і тривалого психоемоційного впливу та

шляхом утримання тварин у перенаселених клітках впродовж трьох тижнів із щоденною зміною угруповання, а також – впливу на склад кишкової мікрофлори за допомогою антибіотику та пробіотику. Описані застосовані методи досліджень – імуногістохімічні, імуофлюоресцентні із застосуванням моноклональних антитіл, дозволяють достовірно візуалізувати імунопозитивні клітини в різних морфофункціональних зонах гістологічних зрізів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини. Використання молекулярно-генетичного аналізу із проведенням полімеразно-ланцюгової реакції у системі реального часу – сучасний і актуальний метод дослідження. Для обробки результатів досліджень застосовувались сучасні методи статистики – реєстрацію даних проводили у програмі EXCEL з пакету MSOffice 2010 (Microsoft Corp., США), статистичну обробку – у програмі STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Третій розділ **«Молекулярно-генетичний аналіз впливу ХСС на експресію генів NR3C1- і ADRB2-рецепторів, прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-17 $\alpha$  та NLRP3-інфламасоми у КАЛТ щурів»** представлений результатами власних досліджень особливостей впливу хронічного соціального стресу на рухово-дослідну та емоційну активність щурів, а також на рівень експресії мРНК Nr3c1- і Adrb2-рецепторів, прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-17 $\alpha$  та Nlrp3-інфламасоми імунними клітинами КАЛТ у щурів.

Новими є результати вивчення рівня експресії мРНК глюкокортикоїдних і адреналінових рецепторів (Nr3c1 і Adrb2). Показано, що при хронічному соціальному стресі спостерігається зниження рівня експресії, що і може обумовлювати резистентність до глюкокортикоїдів та катехоламінів, а, з іншого боку – пояснює превалювання прозапальної сигналізації. Слід відмітити, що здобувач завдяки використанню відомих та апробованих методик доказав адекватність використаної моделі розвитку стресу – тривожності та депресивності.

Наприкінці розділу наведено коротке узагальнення отриманих результатів. Розділ ілюстрований 4 рисунками та містить 1 таблицю.

У четвертому розділі **«Вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію вроджених компонентів імунної системи КАЛТ щурів лінії Вістар»** наведені результати досліджень особливостей впливу хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на особливості структурно-функціональної організації заповнених лімфоцитами ворсинок та експресію TLR2/4 типу і транскрипційного фактору Nf-kB у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині. Цей розділ видався надзвичайно інформаційно насиченим; в результаті було встановлено, що, незважаючи на велику кількість робіт, що свідчать про протизапальні ефекти лактобактерій, їх пероральний прийом в умовах стресу може посилювати в окремих зонах кишково-асоційованої лімфоїдної тканини експресію патерн-розпізнавальних рецепторів. Стрес також впливав на щільність TLR2/4 і концентрацію Nf-kB в імунопозитивних клітинах. Введення канаміцину, в цілому, призводило до зниження кількості TLR2+-, TLR4+- і Nf-kB+-клітин.

Дані власних досліджень оформлені у 19 таблицях і містять 3 рисунки.

У п'ятому розділі **«Вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію транскрипційних регуляторів диференціювання Т-лімфоцитів в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів»** за таким самим принципом наведені результати досліджень особливостей експресії транскрипційних регуляторів диференціювання Т-лімфоцитів у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів в умовах хронічного соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. Автором підкреслено, що ефекти пробіотиків в умовах стресу відрізняються від їх класичних ефектів і в окремих випадках активація адаптивних компонентів КАЛТ, що викликана прийомом лактобактерій, може тільки підтримувати і без того посилений рівень прозапальної сигналізації в цьому регіоні.



Дані власних досліджень оформлені у 16 таблицях і містять 3 рисунки.

Шостий розділ **«Вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію імунної субодиниці протеасоми LMP2 та транскрипційного фактору XBP1 в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів»** присвячений опису результатів власних досліджень особливостей експресії імунної субодиниці протеасоми LMP2 та транскрипційного фактора XBP1 в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів в умовах хронічного соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. Проведені дослідження свідчать про те, що зміни експресії транскрипційного фактору XBP1 та імунної субодиниці протеасоми LMP2 в умовах стресу можуть бути одними з тригерів розвитку запальних захворювань кишківнику.

Дані власних досліджень оформлені у 6 таблицях і містять 5 рисунків.

Сьомий розділ **«Аналіз і узагальнення результатів дослідження»** дозволив автору зібрати разом велику кількість фактичного матеріалу, наведеного у попередніх розділах та зробити логічні висновки і викласти їх в узагальнюючій схемі «Імунні механізми активації прозапальної сигналізації в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині в умовах хронічного соціального стресу», яка логічно впливає з результатів роботи. Висновки послідовно узагальнюють проведені дослідження і складаються з п'яти пунктів, відповідають меті і завданням дослідження, підсумовують аналіз одержаних результатів і заперечень не викликають.

**Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.**

Дисертаційна робота І.О. Топол **«Функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори»**, без сумніву, є актуальною. Дані, отримані в ході дослідження, носять характер нових наукових результатів. Підтвердження висловленої гіпотези великим і різноманітним фактичним матеріалом забезпечує достовірність висновків і практичних рекомендацій, одержаних автором. Однак робота не позбавлена деяких недоліків.

**Зауваження:** Дисертація має достатній обсяг і є завершеною дослідницькою роботою та заслуговує в цілому високої оцінки, проте характеризується певними недоліками. Ряд зауважень і пропозицій були обговорені з дисертантом, взяті до уваги та опрацьовані.

У порядку наукової дискусії та обговорення подальшого розвитку роботи можна відмітити такі зауваження щодо оформлення та змісту дисертації.

1. Текст перенавантажений великою кількістю скорочень (абревіатур), у тому числі англomовними, не всі з яких наведені у переліку скорочень.

2. У огляді літератури доречно було б додати більш детальний аналітичний опис експериментальних моделей хронічного соціального стресу у тварин та обґрунтувати обранні методики.

3. Дослідження проведено у самиць щурів, але естеральний цикл не був взятий до уваги, тоді як загальновідомо, що хронічний стрес визиває оваріальну дисфункцію з розвитком гіпогонадотропної гіпоестрогенії та гіперпролактинемії, а, можливо, – й гіперандрогенемії.

4. Доречним було б визначення рівню у крові глюкокортикоїдів (для щурів – кортикостерону) та катехоламінів (адреналін, норадреналін і ДОФА). Не виключено, що тривалий, протягом трьох тижнів стресорний вплив призводив до виснаження секреторного процесу наднирникових залоз (гіпокортицизм) та на момент проведення досліджень мала місце виражена глюкокортикоїдна недостатність. Тоді б треба було казати не про вплив хронічного стресу, а про вплив надниркової недостатності на лімфоїдну тканину кишечника.

5. З іншого боку лишився не вивченим стан кишкової мікрофлори. Можливо, що внаслідок порушення нейро-гуморальної регуляції при хронічному стресі розвивався «синдром подразненого кишечника» з активізацією мікрофлори, що і викликало закономірну активацію експресії TLR2/4 і Nf-kB у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині, як і інші прозапальні зсуви імунної системи.

Зазначене не зменшує загальної позитивної оцінки дисертації, а, навпаки, показує її високий науковий рівень як фундаментальної роботи, яка відкрила нові факти, які ще потребують свого осмислення, але ж, безумовно, суттєво доповнюють класичні уявлення про патогенез стрес-індукованих захворювань.

Поряд з цим виникло і ряд дискусійних питань.

1. У роботі ретельно описані результати поведінкових тестів. У зв'язку з цим, чи не були виявлені прямі залежності ступеню зниження дослідної та рухової активності щурів, розвитку тривожності та депресії з результатами кількісних імуногістохімічних та генетичних досліджень?

2. Відомо, що поряд з дією антигену в комплексі з МНС II типу, такі фактори як  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{IL-23}$  через індукцію експресії декілька транскрипційних факторів ( $\text{ROR}\gamma$ ,  $\text{STAT3}$ ,  $\text{IRF4}$ ,  $\text{BATF}$ ) визначають диференціювання  $\text{Th0}$  у напрямку  $\text{Th17}$ . Чому Ви обрали саме  $\text{ROR}\gamma$ ?

3. Згідно до Вашої думки, яке є пояснення встановленому факту про зниження рівня експресії мРНК  $\text{Nr3c1}$ - і  $\text{Adrb2}$ -рецепторів в імунних клітинах при хронічному стресі і чому саме це має нівелювати імуносупресивні ефекти глюкокортикоїдів?

4. Ви вважаєте, що механізмом розвитку глюкокортикоїдної резистентності може бути зниження рівня експресії їх рецепторів. Які ще можуть бути механізми (зниження кількості та афінності рецепторів, їх внутрішньоклітинне блокування, синтез ізомерних форм тощо)?

5. Як Ви ставитеся до можливого розвитку у щурів за такою моделлю хронічного стресу «синдрому подразненого кишечника»? Відомо що його картину складають такі симптоми як спастична біль у животі, проноси або закріпи, дисбактеріоз та розвиток ознак запалення слизової оболонки кишечника, у тому числі – й прозапальні реакції, які подекуди набувають системного характеру (лихоманка, лейкоцитоз та інші). До того ж серед інших реакцій у тварин Ви відмічали збільшення частоти дефекацій в 3-4 рази.

### **Заключення.**

Дисертаційна робота Топол І.О. «Функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори», подана в спеціалізовану вчену раду Д. 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук є завершеною науковою працею, у якій автор із використанням сучасних методів дослідження отримав нові дані про функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини в умовах хронічного соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. За своєю актуальністю, науковим і практичним значенням, глибиною і обсягом досліджень, змістом та оформленням робота повністю відповідає вимогам ДАК МОН України про присудження наукових ступенів стосовно дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її виконавець, Топол Інна Олександрівна, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

### **Офіційний опонент:**

завідувач відділу патофізіології,  
імунології та трансплантології  
Українського науково-практичного  
центру ендокринної хірургії,  
трансплантації ендокринних  
органів і тканин МОЗ України,  
д.мед.н., професор

С. В. Зябліцев

*Зябліцев С. В. Зябліцев*  
*інспектор з кадрів*

