

## ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Топол Інни Олександрівни** «Функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори», подану до спеціалізованої Вченої ради Д26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.03.04. — патологічна фізіологія

**Актуальність теми.** Органи і структури, які відносять до імунної системи (червоний кістковий мозок, тимус, мигдалини, лімфатичні вузли, лімфоїдні бляшки і поодинокі лімфоїдні вузлики, селезінка та ін.), продовжують активно вивчати дослідники різних спеціальностей.

Протягом останнього десятиріччя з'являється все більше робіт, присвячених ключовій ролі імунної системи слизової оболонки в реалізації протиінфекційного захисту організму. Адже слизова оболонка, перш за все дихальних шляхів та шлунково-кишкового тракту, є основним місцем контакту із зовнішнім середовищем та всіма можливими патогенами (загальна площа слизових оболонок різних органів і систем організму сягає  $>400\text{ м}^2$ , тоді як шкіри —  $1,8\text{ м}^2$ ). А мікрофлора кишечника бере участь у формуванні імунітету організму. Порушення її складу може призвести до ослаблення клітинних і гуморальних факторів імунітету та неспецифічної резистентності, напруженості імунітету (в т. ч. — підтримання необхідного «тонусу» протипухлинної оборони).

На особливу увагу заслуговують відомості про будову, розвиток, становлення органів і систем, що забезпечують захист і адаптацію організму при несприятливих впливах різних факторів екзогенної і ендогенної природи.

Ендогенними етіологічними причинами порушення нормального біоценозу кишечника є неправильний або незвичний ритм харчування, безсистемне і необгрунтоване застосування антибактеріальних препаратів, імунодепресантів, стероїдних гормонів, виснаження організму у зв'язку з ростом злоякісних новоутворень, алергічними реакціями (особливо харчова алергія), зниження імунологічної реактивності організму. А також це - хронічний соціальний стрес (ХСС), який став невід'ємною частиною сучасного життя, здатен викликати значні порушення не тільки у нейроендокринній системі, спричиняючи розвиток стану депресії і тривоги, але і призводити до змін у функціонуванні вродженого та адаптивного імунітету. Стрес-індукована імунна дизрегуляція може бути тригером розвитку багатьох

патологічних станів (цукровий діабет 1 типу, запальні захворювання кишківника, інфекції і пухлини).

Сьогодні актуальності набувають роботи присвячені лімфоїдним структурам: згрупованим лімфоїдним вузликам (lymphocyte-filled villi = LFV) та заповненим лімфоцитами ворсинкам клубової кишки, так як тут лімфоїдні елементи знаходяться в безпосередній близькості до епітелію і навіть проникають в його товщу.

В дизайні дослідження проявляється воля дисертанта з'ясувати механізми змін функціонального стану імунних структур, асоційованих зі слизовими оболонками клубової кишки в умовах хронічного соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. Застосовуються морфометричні, денситометричні, імуногістохімічні, імунофлюоресцентні методи аналізу, а також новітні стратегії оцінки, що включають геноміку, транскриптоміку, протеоміку (ОМІКС-техніки), що разом надають виняткові переваги в досягненні поставленої мети і вирішенні важливого для патофізіології наукового завдання.

**Наукова новизна та ступінь обґрунтованості висновків дисертації.** Дані дисертаційної роботи отримані з використанням апробованих методів, які адекватно підібрано для вирішення конкретних завдань, а також їх інтерпретація мають не заперечне фундаментальне значення. Так, вперше виявлено, що розвиток ХСС призводить до зниження рівня експресії в КАЛТ мРНК Nr3c1- і Adr $\beta$ 2-рецепторів та одночасного суттєвого збільшення транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-17а та Nlrp3-інфламасоми, що є причиною резистентності лімфоцитів до глюкокортикоїдів і катехоламінів та розвитку запального процесу.

Вперше доведено, що в умовах ХСС зростає кількість TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів в КАЛТ, збільшується чисельність Nf-kB<sup>+</sup>-клітин, змінюється баланс TLR2<sup>+</sup>/TLR4<sup>+</sup>- клітин і щільність TLR2 і TLR4 на мембрані, що свідчить про активацію вродженої імунної системи.

Вперше встановлено, що розвиток ХСС збільшує кількість T-bet<sup>+</sup>- і Ror $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію T-bet, Ror $\gamma$ t і GATA3 в лімфоцитах. Ці зміни відбуваються на тлі зменшення кількості Т-регуляторних CD25<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup>- і CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів, зростання співвідношення T-bet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup> та зниження Foxp3<sup>+</sup>/Ror $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин і свідчать про домінування в умовах ХСС Th1- і Th17-диференціювання на тлі супресорної недостатності.

З'ясовано, що в умовах ХСС порушується система «відповіді на не згорнуті білки», що на тлі імунопротеасомного дефекту може впливати на генерацію імунодомінантних епітопів в КАЛТ, виживання і диференціювання лімфоцитів.

Експериментально обґрунтована необхідність обережно ставитися до модуляції складу кишкової мікрофлори в умовах ХСС через вірогідність посилення рівня про-запальної сигналізації.

Загалом, наукові положення та висновки, представлені в дисертації, базуються на достатньому матеріалі та забезпечені новітніми методичними підходами. Достовірність результатів зумовлено значною кількістю зібраних даних та застосуванням сучасних методів математичного аналізу.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані дані мають фундаментальне і прикладне значення для сучасної патофізіології і імунології оскільки поглиблюють сучасні уявлення про ключові механізми змін вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ в умовах ХСС. Встановлені нові механізми, які пояснюють превалювання про-запальної сигналізації в КАЛТ при стресі.

Дисертанткою, спільно із співавторами, були оновлені і доповнені методи ідентифікації в гістологічних зрізах Th17-клітин і CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Т-регуляторних лімфоцитів. Розроблено спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків архівних тканин.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені в наукову роботу та навчальний процес кафедри патофізіології Дніпропетровської медичної академії МОЗ України, Тернопільського державного медичного університету ім. Горбачевського, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», Харківського національного медичного університету, кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології медичного інституту Сумського державного університету.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана в Запорізькому державному медичному університеті в рамках планової науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології (2013-2017 р.р.) на тему: "Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології" (№ державної реєстрації 0108U005113). Здобувач є співвиконавцем теми.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 211 сторінках друкованого тексту. Складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаної літератури, який охоплює 297 найменувань. Робота ілюстрована 25 рисунками, 44 таблицями.

**Зміст роботи.** Ознайомлення із текстом дисертації Топол І.О. дає підстави стверджувати, що робота виконана на сучасному



методичному рівні із використанням значної кількості експериментального матеріалу та ряду патофізіологічних (моделювання хронічного соціального стресу), гістологічних, морфометричних і денситометричних (визначення розмірів клітин, концентрації транскрипційних факторів), імуногістохімічних й імунофлюоресцентних (ідентифікація імунопозитивних клітин), молекулярно-генетичних (виділення тотальної РНК, отримання кДНК, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (ПЛР-РЧ), статистичних методів. Достатній об'єм проаналізованого матеріалу та застосування адекватних методів статистичного аналізу дозволили вирішити всі поставлені завдання, зробити висновки, що логічно витікають із проведеного дослідження. Слід відзначити чітку структурованість, послідовність і логічність викладення, якісне оформлення тексту.

У **вступній частині** тексту дисертації представлено обґрунтування актуальності теми дослідження, сформульовано загальну мету дослідження та чітко сформульовано чотири завдання.

**Огляд літератури** представлено сучасні уявлення про морфофункціональний стан вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ, участь її клітинних субпопуляцій у фізіологічних та патологічних процесах за такою схемою: 1.1. Структурно-функціональна організація КАЛТ та її вроджених компонентів. 1.2. Адаптивні компоненти КАЛТ. 1.3. Функціональний стан КАЛТ в умовах хронічного соціального стресу.

Є висновок по огляду літератури, у якому формулюється предмет: «характер змін вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ при ХСС практично не відомий, тому з'ясування цих особливостей є головним предметом даного дослідження», експериментальний підхід: «експериментальні моделі різних стресів, які супроводжуються зниженням ГК сигналізації, є хронічними й психосоціальними за своєю природою, як і людські стресори, що провокують розвиток аутоімунних і запальних захворювань. Тому, саме ХСС є одним з найбільш перспективних експериментальних підходів для вивчення механізмів, що лежать в основі викликаних стресом захворювань, у тому числі ЗЗК» та актуальність майбутніх власних досліджень з акцентом необхідності уточнення класичної парадигми стресу, а саме автор вважає, що «події, які відбуваються в КАЛТ в умовах ХСС явно суперечать класичній парадигмі стресу, згідно якої в умовах посилення резистентності ГК до їх рецепторів, провокується розвиток не імуносупресію, а вираженої активації імунної системи і запального процесу».

Використано 297 джерел, з них останніх років 2014-2016 – 38. Написаний добре, читається легко.

**Розділ 2 «Матеріали та методи дослідження».** Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів досліджень на тваринах» (Україна, 2001), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і згідно "Положень про використання тварин в біомедичних дослідженнях".

Приведено розподіл тварин в експериментальних серіях (таблиця 2.1), а також у відповідності до даних літератури докладно описано експериментальні моделі: моделювання хронічного соціального стресу 1 типу (ХСС1) і моделювання хронічного соціального стресу 2 типу (ХСС2). Дизайн поведінкових експериментів включав в себе 3 тести: поведінковий тест «Відкрите поле», тест Порсолта і тест «Перегородка».

Всі використовувані автором методи дослідження: патофізіологічні, молекулярно-генетичні (виділення тотальної РНК, приготування кДНК, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (ПЛР-РЧ), морфометричні, денситометричні, імуногістохімічні, імунофлюоресцентні, статистичні методи аналізу – описані достатньо детально і повно.

**Результати досліджень** представлено у чотирьох розділах. Розділ 3 присвячено молекулярно-генетичному аналізу впливу ХСС на експресію генів Nr3c1- і Adrb2-рецепторів, прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-17 $\alpha$  та Nlrp3–інфламасоми у КАЛТ. У розділі 4 – дані про вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію вроджених компонентів імунної системи КАЛТ. У розділі 5 – оцінка впливу хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію транскрипційних регуляторів диференціювання Т-лімфоцитів в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині. Розділ 6 – дані про вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію імунної субодиниці протеасоми LMP2 та транскрипційного фактора XBP1 в кишково-асоційованій лімфоїдній. Всі розділи завершуються підсумковими узагальненнями (висновками).

**Аналіз та узагальнення результатів досліджень** подано у 7 розділі дисертаційної роботи. Тут автор підсумовує отримані дані, детально і глибоко аналізує матеріали дослідів, дає власну інтерпретацію механізмів процесів, які досліджувалися та порівнює їх із сучасними даними літератури, дає їх теоретичне обґрунтування.

Обговорення отриманих результатів проведено об'єктивно та змістовно.

Роботу завершують п'ять висновків, які представлені у відповідності сформульованих завдань і відповідають меті. Всі є обґрунтованими, конкретними, логічними чітко сформульованими.

Список літератури подано згідно вимог до оформлення відповідного розділу дисертаційної роботи.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.** За матеріалами дисертації опубліковано 27 наукових праці, з них 12 статей (з яких 12 – у виданнях іноземних держав та у виданнях України, які включені до міжнародних науко-метричних баз), 3 патенти на корисну модель, 12 – тези у матеріалах наукових конференцій.

Хочу особливо відзначити участь дисертантки – аналіз літератури та результатів дослідження в розробці патентів на корисну модель: «Спосіб ідентифікації Т-хелперів 17 типу (Th17). Патент України №72776», «Спосіб ідентифікації натуральних CD25+Foxp3 регуляторних Т-клітин. Патент України №72775», «Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин. Патент України № 102400».

#### **Зауваження:**

1. При описі об'єкта дослідження, а саме «Об'єкт дослідження – механізми імунних порушень в КАЛТ у щурів, які піддавалися дії ХСС». На мою думку має бути уточнено до наступного: «Об'єкт дослідження - молекулярно-патофізіологічні і структурні особливості стану компонентів КАЛТ клубової кишки у самок щурів в нормі».
2. Дослідження соціальної поведінки експериментальних тварин (з результатів) можуть бути винесені в розділ 2 (матеріали і методи), або відповідно має бути сформульовано таке завдання.
3. Вступ (дані, подібні до огляду літератури, на початку розділів №3, 4, 5, 6) можуть бути перенесені в огляд літератури або в розділ №7 (аналіз та обговорення результатів). А висновки в кінці розділів №3, 4, 5, 6 – окремо не виділяти і не включати в зміст.
3. Ніде в роботі не вказано  $n$  –кількості повторів біля значка вірогідності  $P < 0.05$ .
4. Так, як модуляція складу кишкової мікрофлори (Розділ 2, п.2.3.4.) базується на припущенні про те, що «поява нових М-клітин є процесом індукційним, і одним з таких індукторів їх утворення є аміноглікозидний антибіотик Канаміцин». Введення пробіотика Лактобактеріну (суміш живих ліофільно висушених лактобактерій) здатне впливати на кількість основних регуляторів диференціювання



наївних Т-клітин у прозапальні Th17 клітини – саме головне – сегментарних ниткоподібних бактерій, які стимулюють утворення Т-регуляторних клітин і продукцію суп ресорного цитокіну ІЛ-10, тобто, – є одним з важливих регуляторів балансу Th 17/Treg в КАЛТ – тому слід обґрунтувати відсутність двох групи тварин, як контроль на Канаміцин (7 діб, 15 мг/кг) та Лактобактерин (три тижні, 4 на 10 у 8 КУО).

5) Тільки три ключевих слова, що є замало!

Зроблені зауваження не знижують теоретичної та практичної цінності дисертації, не знижують позитивної оцінки дисертації в цілому, а також зроблених основних висновків.

Автореферат відображає основний зміст дисертації.

Наукові та практичні результати проведених досліджень можна кваліфікувати як нове вирішення актуального наукового завдання.

## **ЗАГАЛЬНИЙ ВИСНОВОК ПО ДИСЕРТАЦІЙНІЙ РОБОТІ**

Дисертаційна робота Топол Інни Олександрівни «Функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори», подану до спеціалізованої Вченої ради Д26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за фахом 14.03.04. — патологічна фізіологія, у якому автор із використанням сучасних методів отримала нові дані про особливості функціонування кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів та встановлені імунні механізми активації прозапальної сигналізації у КАЛТ в умовах хронічного соціального стресу – присвячена вивченню важливого наукового завдання. Якість виконання експериментів, правильна статистична обробка, об'єктивний аналіз одержаних результатів, співставлення зі сучасними літературними даними дозволяють високо оцінити дисертаційну роботу. Тема роботи, об'єкт та предмет дослідження, її зміст, а також основні положення та висновки відповідають паспорту спеціальності 14.03.04. — патологічна фізіологія. У дисертаційній роботі містяться раніше не захищені положення.

На підставі аналізу дисертації Топол І.О., автореферату дисертації, публікацій дисертанта у фахових наукових виданнях можна зробити висновок, що за критеріями актуальності, новизни, науковим і практичним значенням, обсягом і глибиною досліджень, аргументованістю висновків, повноти викладення результатів у наукових публікаціях, змістом та оформленням дисертаційна робота

«Функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори» є закінченим науковим дослідженням, яке відповідає всім вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567, а її виконавець, Топол Інна Олександрівна, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.04. — патологічна фізіологія:

Офіційний опонент

Провідний науковий співробітник

Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ

Доктор біологічних наук

Блашків Т.В.

