

ВІДГУК

на дисертацію Коваленко Тетяни Ігорівни «Вікові особливості зміни показників клітинного та гуморального імунітету після дії інфекційних антигенів в експерименті», подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 –фізіологія людини і тварин до спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України.

Актуальність обраної теми дисертації. Сучасна демографічна ситуація у світі характеризується поступовим збільшенням абсолютної та відносної кількості населення похилого віку при одночастному скороченні частки працездатного населення. Ця проблема має як фундаментальні економічні, так і біологічні аспекти.

Відповідно до сучасної концепції біogerонтології, порушення функціонального стану імунно-нейроендокринного комплексу є однією з основних причин прискореного старіння. Наукові дослідження спрямовані насамперед на з'ясування причин, механізмів і наслідків змін в імунній системі внаслідок старіння. У статті, опублікованій у 2017 році в авторитетному журналі «Journal of Biological Chemistry», обговорювалися неферментативне пошкодження молекул як прототип руйнівного впливу та здатність «надлишкових» властивостей метаболітів викликати старіння живих систем, що, за даними багатьох авторів, має базисне значення для теорії хімічних основ старіння [Golubev, Hanson, Gladyshev, 2017].

В нашій країні найбільш відомі роботи з питань геронтології - це наукові розробки академіка АН України Г.М. Бутенко, який разом із колегами проводив експериментальні та клінічні дослідження з пошуку засобів корекції вікових порушень стану імунної системи, зокрема імунодефіциту та аутоімунності. Для вивчення механізмів виникнення вікових змін у системах і органах унаслідок старіння він створив оригінальні модельні системи (гетерохронні химери, гетерохронний парабіоз) та підходи до оцінювання імунного стану людей похилого віку; показав роль

імунологічних механізмів у патогенезі основних форм зумовленої віком патології — атеросклерозу, гіпертонії, паркінсонізму, хвороби Альцгеймера та ін. Неабияку роль у його пошуках відіграло й те, що Г. М. Бутенко очолив Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, центральним напрямом наукової діяльності якого є вивчення генетичного підґрунтя захворювань і закономірностей регенерації для активного втручання в перебіг патологічних процесів за допомогою сучасних молекулярно-генетичних і клітинних технологій. Проведені дослідження дали змогу висунути гіпотезу про існування активного чинника, що виникає в старому організмі й негативно впливає на функціонування різних фізіологічних систем. Аналіз сучасної літератури свідчить про те, що не зважаючи на визнання питань геронтології значущими медико-соціальними проблемами сучасності, механізми порушень імунної реактивності на інфекційні агенти в залежності від віку та можливості корекції цих порушень залишаються дискусійними і недостатньо вивченими.

Робота Коваленко Тетяни Ігорівни «Вікові особливості зміни показників клітинного та гуморального імунітету після дії інфекційних антигенів в експерименті» присвячена актуальній проблемі фізіології та медицини в цілому – механізмам розвитку вікових відмінностей адаптаційних можливостей організму та розробці патогенетично обґрунтованих принципів та методів їх корекції. Метою роботи стало дослідження динаміки залежної від віку імунореактивності на інфекційні агенти та можливості корекції цих станів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у рамках фрагмента теми кафедри мікробіології ХНМУ «Експериментальне мікробіологічне обґрунтування протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань» (номер державної реєстрації теми 0114U003390), а також у рамках фрагмента теми НДІ біології «Розробка теорії експериментальної регуляції тривалості онтогенезу» (номер державної реєстрації 0115U000486).

Наукова новизна дослідження та отриманих результатів. Наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані в дисертації, збагачують рівень знань щодо вікових особливостей імунної відповіді.

Проведене дослідження показало, що у молодих і у старих тварин після інфікування грамнегативними мікроорганізмами (*P. aeruginosa* і *E. coli*) спостерігалися різні стратегії процесингу бактеріальних антигенів. У тварин старшої групи після інфікування досліджуваними мікроорганізмами були більш виражені показники вродженого імунітету.

Уперше показано, що досліджувані імунокоректори мають різні механізми впливу на експериментальних тварин залежно від віку тварин й термінів введення імунокоректорів на різних стадіях запалення. Отримані результати дозволяють обґрунтувати доцільність застосування досліджуваних імунокоректорів в залежності від стадії запального процесу та віку.

Практичне значення отриманих результатів.

Дисертаційна робота відноситься до фундаментальних досліджень. Разом з тим отримані фундаментальні знання становлять основу для проведення обґрунтованої корекції імунних порушень. Уперше показано, що досліджувані імунокоректори мають різні механізми впливу на експериментальних тварин в залежності від віку тварин і термінів введення імунокоректорів на різних стадіях запалення.

Отримані результати розширюють і поглиблюють існуючі уявлення про вікові особливості вродженої імунореактивності, тому вони можуть бути впроваджені в науково-дослідну роботу та викладання на кафедрах фізіології низки вищих біологічних та медичних навчальних закладів України.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

В роботі використані класичні лабораторні методи досліджень, адекватні до поставлених завдань. Дослідження було проведено в сертифікованій лабораторії з використанням тест-систем, реактивів та обладнання відповідних виробників.

Статистичну обробку та порівняння отриманих результатів проводили за допомогою сучасних інформативних методів математичної статистики. Було використано непараметричні методи та методи кореляційного аналізу.

Результати дослідження добре аргументовані, виконані на достатній кількості експериментальних тварин, *фактичні дані зведені у порівняльних таблицях та рисунках*. Висновки відображають всі закономірності, які виявлені в процесі проведеного статистичного аналізу. Отримані нові дані, які мають наукову та практичну значимість, тому дана дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки.

Оцінка дисертації щодо її змісту та оформлення.

Дисертаційна робота Т.І. Коваленко оформлена стандартним чином згідно з традиційними принципами та відповідає вимогам до дисертацій.

Дисертація викладена на *137 сторінках* комп'ютерного тексту і складається з таких необхідних розділів: вступ; огляд літератури; матеріали та методи дослідження; результати власних досліджень, розділу аналізу і узагальнення отриманих результатів; завершується висновками, практичними рекомендаціями та переліком використаної літератури 186 джерел. Робота ілюстрована 24 таблицями та 7 рисунками.

Текст дисертації, як за змістом, так і редакційно викладено і оформлено здобувачем якісно, назва роботи повністю відповідає меті та основному змісту дисертаційної роботи. Викладення основних положень роботи за стилем та термінологією заслуговує високої оцінки. Фактичний матеріал таблиць і графіків вміщує достатню кількість інформації.

У вступі достатньо переконливо визначена актуальність проблеми, обґрунтовано доцільність власних досліджень, вказано їх зв'язок з плановими НДР. Зазначено особистий внесок здобувача. Наведено відомості щодо апробації

результатів дисертаційного дослідження та їх публікації, які свідчать про достатній рівень обговорення матеріалів роботи.

В огляді літератури описані чинники первинного вродженого та вторинного адаптивного імунітету. Наведено дані щодо взаємодії мікроорганізмів з макроорганізмом, стадії запального процесу та дії ліпополісахариду грамнегативних збудників.

У другому розділі (матеріали і методи дослідження) автором ретельно описані використані в роботі методи дослідження, які відповідають поставленим завданням.

Слід підкреслити, що викладення цього розділу роботи свідчить про самостійне оволодіння дисертанткою всіма необхідними для здійснення даної роботи методами експериментального дослідження.

У третьому розділі в Коваленко Тетяною Ігорівною викладаються результати власних досліджень, які склалися з двох етапів.

На першому етапі експерименту проводили оцінку фізіологічних параметрів, а також показників вродженого та адаптивного імунітету у контрольних тварин різного віку, а також експериментальних тварин різного віку на тлі запального процесу після внутрішньочеревинного введення грамнегативних антигенів.

Дисертантом було доведено, що показники вродженої імунореактивності та імунорезистентності, а також гуморальні показники адаптивного імунітету виявили різні імунні реакції у молодих та старих тварин в залежності від виду антигену, від терміну дослідження та від природи імунокоректора.

Показники окислювального резерву нейтрофілів у НСТ-тесті, кількість активних фагоцитів, їх поглинальна спроможність, індекс завершеності фагоцитозу та вміст опсонізуючого фактора фагоцитозу C3 фрагмента комплементу були вище у 3-х місячних контрольних тварин порівняно зі старшою контрольною групою, що свідчить про їх високу реактивність. При дослідженні показників адаптивного імунітету було виявлено, що утворення

циркулюючих імунних комплексів у 3-х місячних контрольних тварин було в 2 рази вище, ніж у контрольних 22-х місячних тварин, а концентрація Ig A була вище у старшій віковій групі контрольних тварин порівняно з молодшими тваринами.

На тлі запального процесу, індукованого грамнегативними мікроорганізмами експериментальних тварин різного віку спостерігали різного ступеня пригнічення чинників вродженого імунітету (фагоцитарної активності нейтрофілів та вмісту C3 фрагмента комплементу) у 3-х місячних експериментальних тварин протягом усього експерименту.

З боку адаптивного імунітету у експериментальних тварин двох вікових категорій спостерігали достовірне збільшення як концентрацій Ig A, M і G, так і інтенсивності утворення ЦК після введення антигенів *P. aeruginosa* і *E. coli*.

На другому етапі експерименту дисертанткою вивчався спільний вплив бактеріального антигену та двох імунокоректорів.

У ході дослідження спільного впливу бактеріального антигену та імунокоректора, який вводили в різні терміни експерименту, Коваленко Т.І. було виявлено, що застосування бромид азоксимера через 24 години після активації запалення інфекційним антигеном у експериментальних тварин двох вікових груп приводило до достовірного збільшення індукційної ферментативної активності нейтрофілів у НСТ-тесті, а застосування цього препарату превентивно до введення антигену *E. coli*, навпаки, викликало інгібування активації внутрішньоклітинної НАДФ-Н-оксидазної системи. Отримані результати свідчать про доцільність та необхідність патогенетично обґрунтованої схеми імунотерапії.

При дослідженні впливу другого імуномодулятора - експериментального композитного препарату М. - у тварин старшої вікової групи було виявлено виражену стимуляцію функціональної активності процесингу антигенів, про що свідчать високі показники індексу завершеності фагоцитозу. У експериментальних тварин старшої групи

препарат М. стимулював утворення комплексу антиген-антитіло-комплемент з подальшою елімінацією цього комплексу протягом усього експерименту.

Таким чином, в дисертаційній роботі доведено, що для молодих тварин більш характерна висока імунореактивність, а для тварин старшої групи більш висока імунорезистентність при індукції запальної реакції за допомогою бактеріальних антигенів.

Дисертантом зазначено, що той факт, що зі збільшенням віку імунні реакції організму на інфекційні антигени відрізняються від реакцій у молодих організмів, не завжди слід трактувати як зниження адаптаційного потенціалу. Найімовірніше, з віком змінюється стратегія адаптації, а не здатність організму до неї.

У заключному розділі здобувач не обмежується простою сумациєю матеріалу, а надає його узагальнення та робить підсумок своїм власним і літературним даним. Робота логічно завершується 6 висновками, які повністю відображають одержані результати проведених досліджень.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях та авторефераті.

Основні наукові положення, висновки та одержані результати досліджень відображені у 18 наукових працях, з них 3 статті (1 – одноосібно) у фахових наукових виданнях (вітчизняних – 2, інших держав – 2) та 7 тези доповідей на наукових конференціях. Опубліковані роботи відповідають вимогам до публікацій результатів дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Апробацію результатів дисертаційної роботи здійснено у формі доповідей і тез на низці міжнародних науково-практичних конференцій.

Автореферат має всі необхідні розділи та за змістом повністю відповідає основним положенням і висновкам, наведеним у дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Принципових зауважень до змісту та оформлення дисертації та автореферату немає, хоча вони й не позбавлені окремих технічних недоліків.

1. НСТ-тест відображає лише інтенсивність кисневозалежних механізмів багатогранних функцій нейтрофілів і свідчать про ступінь активації внутрішньоклітинної НАДФ-Н-оксидазної системи, які є лише фрагментом впливу на поглинання та перетравлювальну активність. З іншого боку, позначення Вами загального фагоцитозу як кисневонезалежного процесу з нашої точки зору вважаємо помилкою, тому що диференціювати кисневозалежні та кисневонезалежні компоненти поглинальної і перетравлювальної активності нейтрофілів у досліджуваних Вами реакціях неможливо.

2. Використовуваний в дисертації термін «гранулоцитарні нейтрофіли» не зовсім відповідає класичним уявленням про гемопоез: агранулоцитарних нейтрофілів не існує, а клітини-попередники гранулоцитарного паростка розподіляють на базофільні, еозинофільні та нейтрофільні.

3. При описі виконуваних у роботі лабораторних досліджень не завжди були представлені виробники реагентів або реактивів.

4. Бажано позначати використовувані Вами імуномодулятори не умовними позначеннями або комерційною назвою, а приводити їх хімічну структуру та опис функціональної активності, що дозволило б більш предметно обговорювати питання щодо їх механізмів впливу.

Після ознайомлення з дисертацією та аналізу результатів досліджень виникли наступні запитання, які слід обговорити під час прилюдного захисту:

1. На підставі яких даних – своїх власних чи отриманих із фахової літератури – автор стверджує, що препарат П. впливає на функціональну активність імунокомпетентних клітин, як антиоксидант? Який механізм дії використовуваних Вами модуляторів (рецепторно-тригерний механізм і послідовність розвитку каскадних реакцій)?

2. Чи не могли б Ви охарактеризувати сучасні методи визначення гемолітичної активності системи комплементу та окремих її компонентів?

3. Як результати вашого дослідження може бути використано у розробці та удосконаленні методів лікування інфекційних процесів?

Вказані запитання є суто дискусійними і аж ніяк не зменшують високу оцінку дисертації та значимість отриманих результатів, а навпаки, відбивають цікавість роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Коваленко Тетяни Ігорівни «Вікові особливості зміни показників клітинного та гуморального імунітету після дії інфекційних антигенів в експерименті» є самостійною, завершеною науково-дослідною працею, що містить нові науково обґрунтовані результати проведених особисто здобувачем досліджень, які розв'язують важливу наукову проблему: механізми порушення функції регуляторних систем організму у експериментальних тварин різного віку мають величезне значення в розкритті та розумінні інтегральних фізіологічних процесів, що забезпечують реактивність і резистентність в онтогенезі.

Таким чином, дисертація повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24. 07. 2013 року, № 567, зі змінами відповідно до постанови Кабінету Міністрів України № 656 від 19 серпня 2015 р. та наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12. 01. 2017 року рекомендувати її до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 - фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент:

завідувач лабораторією

клінічної імунології та алергології

ДУ «Інститут мікробіології та

імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»

доктор медичних наук, професор

Коляда Т.І.