

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертацію Коваленко Тетяни Ігорівни

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

Актуальність теми дисертації. Імунна охорона внутрішнього середовища організму від чужорідних інфекційних й неінфекційних агентів здійснюється шляхом взаємодії багатьох клітинних та гуморальних факторів імунітету. Клітини імунної системи й гуморальні продукти їх життєдіяльності забезпечують вроджені та адаптивні реакції імунної системи.

Порушення функціонального стану імунної та ендокринної систем є однією з основних причин прискореного старіння. З віком відбуваються функціональні зміни регуляторних механізмів імунноендокринного комплексу, змінюються когнітивні функції (пам'ять, увага, орієнтація, вища психічна діяльність). При старінні знижується рівень імунної відповіді, порушується здатність лімфоцитів в передачі міжклітинних сигналів, зменшується різноманітність репертуару Т-клітинних рецепторів, в ендокринній системі, порушується продукція статевих гормонів.

Другим найважливішим фактором захисту, є захист від інфекцій – одна з найважливіших функцій імунної системи. Імунна відповідь визначає варіанти впливу на інфекційні захворювання за допомогою адаптаційного та вродженого імунітету. Простежується чіткий зв'язок функцій імунної системи за віком. Причини цього зв'язка пояснюються тим, що у ранньому

дитячому віці імунна система, ще не сформована і тому недостатньо розвинута. В похилому віці вона має тенденцію до пригнічення. Частково цим пояснюється той факт, що вроджений імунodefіцит притаманний саме юнацькому віку, а специфічний – нерідко зустрічається в похилому віці. Тому з'ясування механізмів що беруть участь в імунотенезі в різних вікових групах під дією інфекційних антигенів є актуальною проблемою.

Робота Коваленко Тетяни Ігорівни «Вікові особливості зміни показників клітинного та гуморального імунітету після дії інфекційних антигенів в експерименті» присвячена актуальній проблемі фізіології, а саме вивченню особливостей імунотенезу на тлі індукованого запалення на експериментальних моделях тварин різного віку, дозволить обґрунтувати підходи до адресної імунотекорекції та імунотрофілактики в різних вікових групах. Метою дисертації було дослідження динаміки залежної від віку імунотекреактивності на інфекційні агенти та можливості корекції цих станів імунотропними препаратами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження, проведені в дисертаційній роботі, виконані в період з 2014 по 2017 рр. у рамках фрагмента теми планової наукової роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунотекрогії 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 одержаних результатів. Полягає в тому що уперше показано, що молоді й старі тварини після інфікування грамнегативними мікроорганізмами (*P. aeruginosa* і *E. coli*) вибирають різну стратегію для процесингу бактеріальних антигенів.

Уперше показано, що при дослідженні ефектів різних інфекційних антигенів спостерігали більш виражену локальну й системну запальну реакцію після введення *E. coli* порівняно з введенням *P. aeruginosa*.

Доведено, що на тлі запального процесу, індукованого введенням *E. coli* та застосування імунокоректора Поліоксидонія у експериментальних тварин двох вікових груп достовірно збільшувалася активація ферментів нейтрофілів та індекс стимуляції фагоцитозу в НСТ-тесті, особливо на ранніх термінах запалення. А застосування препарату превентивно до введення антигену *E. coli*, навпаки, викликало інгібування кисневозалежного фагоцитозу.

Доведено, що після застосування композитного препарату Міксфактор після дії патогена *E. coli* у тварин двох вікових груп спостерігали іншу реакцію – у вигляді стимуляції активності фагоцитозу та збільшення концентрації С3 фрагменту комплемента, який має виражену опсонізуючу дію, що свідчить про адаптивний зв'язок процесів реактивності й резистентності експериментальних тварин різного віку.

Практичне значення одержаних результатів. Полягає в тому, що дані дослідження, можуть бути використані для вибору імуномодельюючих препаратів на різних етапах запального процесу з урахуванням вікових особливостей організму. Отримані експериментальні дані можуть бути використані для розроблення методичних рекомендацій. Імунокоректор Поліоксидоній доцільно застосовувати після індукції запального процесу грамнегативними мікроорганізмами, оскільки він має виражену антиоксидантну активність. Композитний імунопрепарат Міксфактор краще застосовувати превентивно до індукції запалення через те, що цей препарат стимулює експресію генів прооксидантних ферментів. Фрагменти даної роботи можуть викладатися студентам в рамках курсу фізіології, мікробіології та імунології у вищих біологічних та медичних навчальних закладах України.

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

Сформульовані Коваленко Т. І. основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації обґрунтовані достатньою кількістю

експериментальних даних та їх статистичною обробкою. Використані методи наукових досліджень є сучасними і відповідають вирішенню поставлених мети та задач, базуються на сучасних, адекватних та інформативних методах досліджень. Цифровий матеріал повністю ґрунтується на фактичних даних, які піддавалися математичному аналізу.

Обсяг і структура дисертації

Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, висновків та списку використаних літературних джерел, який містить 186 найменувань. Робота викладена на 137 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 24 таблицями та 7 рисунками.

Текст дисертації, як за змістом, так і редакційно викладено та оформлено здобувачем якісно, назва роботи повністю відповідає меті та основному змісту дисертації.

У вступі обґрунтовано актуальність проблеми, визначені мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження, сформульовано наукову новизну, та практичне значення роботи, визначено особистий внесок автора, наведено дані про апробацію отриманих результатів.

Розділ 1 (огляд літератури). В огляді літератури, який складається із двох підрозділів на 28 сторінках викладені сучасні дані про формування вродженої та адаптивної імунорезистентності. Представлені чинники первинного вродженого та вторинного адаптивного імунітету. Визначена роль імунної системи та чинників адаптивного імунітету в процесі онтогенезу. Проаналізована взаємодія антигену з макроорганізмом.

Охарактеризовані збудники, які можуть викликати запальну реакцію організму, а також відповідь імунної системи як лінії захисту при інвазії мікроорганізмів, або їх ендотоксинів.

В кінці розділу зроблено висновок, та надані публікації щодо результатів дисертації.

Розділ 2. (матеріали та методи). Наведена характеристика об'єкту, схема експерименту та методи дослідження. Методи, які були використані є сучасними, коректними в плані вирішення конкретних завдань. Повнота викладення автором фізіологічних, імунологічних та статистичних методів є цілком достатньою для оцінки обґрунтованості експериментальних досліджень, їх сучасності з точки зору забезпечення якості проведення експериментів та можливості їх відтворення.

Дослідження проводились на білих щурах – самцях 3-х місячного та 22-х місячного віку (старих). В експерименті були задіяні інтактні та інфіковані тварини культурою *Pseudomonas aeruginosa* 27835 ATCC та *Escherichia coli* 25592 ATCC. На першому етапі експерименту проводили оцінку фізіологічних параметрів, вродженого та адаптивного імунітету у контрольних тварин (інтактних), а також експериментальних тварин різного віку на тлі запального процесу після внутрішньоочеревинного введення грамнегативних антигенів. В якості показників у тварин використовували біоматеріал для оцінки вродженого (активність фагоцитуючих клітин та C₃ фрагмент комплементу) та адаптивного імуноглобуліни класів (A, M, G та циркулюючі імунні коімплекси) імунітету. На другому етапі експерименту обрали більш патогенний антиген *E. coli* для того щоб вивчити механізм дії різних імунокоректорів. Об'єктами досліджень були імунокоректори – поліоксидоній та міксфактор. Доречно було б дати характеристику цим імунокоректорам (склад, фармакодинамічні особливості, тощо).

Оцінка вродженого та адаптивного імунітету проводилась з використанням сучасних та коректних методів досліджень.

Результати досліджень оброблені сучасними статистичними методами аналізу, є адекватними поставленим задачам.

В розділі 3. (результати й обговорення). Дисертантом представлені результати власних досліджень, які склалися з двох етапів.

Здобувачем було доведено відмінності імунореактивності і імунорезистентності у контрольних тварин в залежності від віку. Показники

вродженого імунітету (кисневонезалежний і кисневозалежний фагоцитоз, вміст білків системи комплементу) у тварин старшої вікової групи були знижені порівняно з молодшою групою. У контрольній молодшій групі індукційний окислювальний резерв фагоцитуючих клітин в НСТ- тесті був вище, ніж у старшій віковій групі експериментальних тварин. Утворення циркулюючих імунних комплексів у 3-х місячних контрольних тварин було достовірно, вище ніж у контрольних 22-х місячних тварин.

В ході експерименту дисертант виявила у молодих тварин їхню високу імунореактивність, а у тварин старшої групи тільки високу імунорезистентність при індукції запальної реакції за допомогою агентів *P. aeruginosa* і *E. coli*.

Після дії бактеріальних суспензій *P.aeruginosa* і *E.coli* інтенсивність утворення ЦІК між антигеном та імуноглобуліном була достовірно збільшена протягом усього експерименту у тварин двох вікових категорій, що свідчить про активацію зв'язування імуноглобулінами бактерій.

На відміну від першого етапу експерименту де вивчали два види інфекційних антигенів у подальшому обрали більш патогенний антиген *E. coli* для того щоб вивчити механізми дії різних імунокоректорів. На другому етапі експерименту вивчали спільний вплив бактеріального антигену та двох імунокоректорів, які вводили в різні терміни експерименту.

У ході дослідження впливу імунокоректора Поліоксидонія, було виявлено, що у експериментальних тварин різного віку превентивно до індукції запального процесу, інфікуванням *E. coli* спостерігалось зниження індексу стимуляції фагоцитів в НСТ-тесті. Цей факт здобувач, пояснює, як виражену антиоксидантну активність, що є негативним для забезпечення фагоцитозу нейтрофілів за допомогою активних форм кисню, який забезпечує ендоцитоз бактеріальних антигенів.

Здобувачем Коваленко Т. І. було доведено, що на тлі введення *E. coli* і застосування експериментального композитного препарату Міксфактора у тварин старшої вікової групи виявили виражену стимуляцію функціональної

активності процесингу антигенів, про що свідчать високі показники індексу завершеності фагоцитозу. У експериментальних тварин старшої групи Міксфактор стимулював утворення комплексу антиген-антитіло-комплемент з подальшою елімінацією цього комплексу протягом усього експерименту.

Аналіз та узагальнення результатів викладено відповідно до послідовності завдань роботи та розділів власних досліджень. Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями в цій галузі. Вони викладені логічно, що свідчить про досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи.

З огляду на прорецензований матеріал можна зазначити, що мета дисертаційної роботи досягнута, а завдання досліджень виконано повною мірою. Отже, дисертаційну роботу можна вважати завершеною. Робота виконана на сучасному науково-методичному рівні і заслуговує позитивної оцінки.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях та авторефераті. За результатами досліджень, наведених в дисертаційній роботі, опубліковано 18 наукових праць, з яких: 3 статті у спеціалізованих періодичних виданнях, що входять до переліку фахових видань України, 2 статті в міжнародних журналах, 2 статті у вітчизняних журналах, 2 статті опубліковано одноосібно та 7 тез в матеріалах науково-практичних конференцій різного рівня. Опубліковані роботи відповідають вимогам що до результатів дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

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.

Дисертація та автореферат здобувача викладені українською мовою з дотриманням наукового стилю. Їх оформлення в цілому відповідає сучасним вимогам МОН України, щодо викладання, об'єму, структури, посилань на джерела літератури. Проте виникли зауваження та запитання.

Зауваження:

Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. Написані вони логічно, з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення, хоча робота і не позбавлена деяких непорозумінь непринципового характеру.

1. Імунокоректори Ви порівняли з інтактним контролем. Цікаво було б провести порівняння імунокоректорів з запалення викликаними *E. coli*. Це розширило б практичне значення Ваших коректорів та застосування в подальшому.
2. Зустрічаються помилки, невдалі вислови, русизми ст. 37, 43, 60, 63 та ін.
3. Не вказано, яким чином розраховували дози імунокоректорів для тварин, або посилань на літературні джерела.
4. Не зрозуміло, яким чином відбувався підбір доз? Доречно було б вводити імунокоректори мл/кг маси тварин, а ні мл./ на тварину.

Запитання:

1. Чому в експерименті були використані тварини однієї статі?
2. Імунокоректори які Ви вивчали мають різний склад. Чи відрізняються вони за фізіологічними властивостями?

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 фундаментальні дані про механізми порушення функції регуляторних систем організму у експериментальних тварин різного віку, які мають велике значення в розкритті та розумінні інтегральних фізіологічних процесів, що забезпечують реактивність і резистентність в онтогенезі.

Таким чином, дисертація за своєю актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, теоретичною і практичною цінністю відповідає

вимогам п. 11 « Порядку присудження наукових ступенів затвердженого постановою КМУ № 567 від 24 липня 2013р. (із змінами, внесеними згідно з Постановою КМ № 656 від 19.06.2015 р. та № 1159 від 30.12.2015р.) до присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри

фізіології та анатомії людини

Національного фармацевтичного університету МОЗ України,

доктор біологічних наук, професор

Малоштан Л. М.

Підпис професора Л.М. Малоштан

Засвідчую

Заступник ректора з питань кадрової роботи

З.Ф. Подстрелова