

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Кріль Ірини Йосифівни «Біохімічні та імунологічні
зміни у крові за умов імунозапального артриту», подану на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04
– біохімія

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Ревматоїдний артрит (РА) - це системне аутоімунне захворювання, за якого імунна система виробляє антитіла до власних синовіальних тканин навколо з'єднань і руйнує їх. Щодо статистики захворювань на РА, то дані, представлені у Вступі, слід уточнити: не лише в Україні, але й в інших країнах, зокрема у США 0,40 % населення хворіє саме на РА, а в результаті неправильного лікування 60 % населення стає недієздатними через 10 років після початку хвороби. Навіть якщо ми оминемо інформацію по населенню віком від 85 р і більше та із зайвою вагою (подану по США і неактуальну для середньостатистичного українця, тому власне і йдеться у Вступі про актуальну загрозу для працездатного віку), то найбільше занепокоєння викликає те, що одна дитина з 250 (віком до 18 р) у США має симптоми артритів (http://www.cdc.gov/arthritis/data_statistics/arthritis-related-stats.htm). Відтак, пошук ефективних методів ранньої діагностики та експериментальних моделей для апробування терапевтичних заходів має нагальне значення.

Численні клінічні прояви ревматоїдного артриту були ретельно охарактеризовані до появи сучасних молекулярних методів. Проте власне застосування молекулярних підходів у останні 10–20 років забезпечило суттєвий розвиток знань про спадкові фактори ризику, основи імунопатогенезу, гетерогенність захворювання з огляду на локалізовані та системні прояви (Weyand and Goronzy, 1997; Smith and Hayes, 2002; Zhang et al., 2006). Проте визнається, що на даний час РА невиліковний. Нові медичні заходи, розроблені протягом останніх 30-ти років, стосуються лише пригнічення запалення та болі, призупинення розвитку хвороби, тобто за влучним порівнянням Smith and Haynes (2002) «виявляють лише вершину айсберга». Тому оцінка адекватності експериментальних схем та нова інформація про молекулярні прояви захворювання мають надзвичайно велику вагу у прогресі розуміння цього захворювання.

Зв'язок з державними і галузевими програмами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі клінічної імунології та алергології ЛНМУ імені Данила Галицького та є фрагментом планової теми кафедри «Оцінка

взаємозв'язку імунологічних, генетичних, гормональних механізмів, вторинних системних васкулітів та поліімунопатології за умов системних захворювань сполучної тканини та оцінка ефективності і безпеки застосування терапії супроводу біофлавоноїдів та бігуанідів» (2012–2016 р). державний реєстраційний номер: 0112U000166.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у створенні доказової бази щодо адекватності моделей гострого та хронічного артритів у експериментальних тварин (щурі, миші) тваринних моделей для відтворення симптомів захворювання на РА у людини на підставі біохімічних та імунологічних показників периферійної крові. Зокрема, оцінка рівня апоптичних клітин, окисного ураження та клінічних характеристик дозволили диференціювати процеси, що відповідають гострому запальному процесі та хронічному артрити. Автором вперше проаналізовано природу «Кисневого вибуху» у лімфоцитах та його наслідків на рівні показників плазми крові на різних стадіях запального процесу. Доведено роль сірководню у розвитку запального процесу при експериментальному артриті. Важливим моментом є ідентифікація протеолітичної активності імуноглобулінів класу IgG сироватки крові щодо гістону H1 за експериментального артрити у тварин і у пацієнтів з РА.

Практичне значення і перспектива роботи зумовлені розробкою селективної моделі для впровадження методів корекції гострого та хронічного РА, а також обґрунтування вибору біохімічних маркерів прогнозування розвитку РА та ефективності терапевтичних заходів, зокрема за ознаками протеолітичної активності IgG-антитіл щодо гістону H1.

Структура роботи

Дисертаційна робота І.Й. Кріль викладена на 139 сторінках (105 стор Основної частини) комп'ютерного набору та побудована за традиційною схемою. Вона складається зі вступу (стор. 8–13), аналітичного огляду літератури (стор. 14–34), матеріалів і методів дослідження (стор. 35–51), розділів, присвячених результатам власних досліджень (стор. 52–103) та їх обговоренню (стор 104–118), завершується вісьма висновками та списком використаної літератури (182 найменування, з яких 117 – латиною). Співвідношення та обсяг окремих частин роботи відповідають рекомендаціям ВАК України. Результати роботи проілюстровані 37 рисунками та 13 таблицями.

У **«Вступі»** автор обґрунтовує актуальність власного дослідження соціальною значимістю терапії ревматоїдного артрити та принциповою важливістю впровадження тваринних експериментальних моделей у з'ясуванні молекулярних основ патогнезу РА. Сформульовані завдання повністю розкривають поставлену мету. Проте при формулюванні мети слід було визначити кінцевий орієнтир дослідження: визначення молекулярних критеріїв імунозапальних артритів на тваринних моделях для діагностики РА у людини на гострій та хронічній стадії захворювання, позаяк дисертант при формулюванні мети визначає засоби її досягнення. Перелік положень, які

мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

У *Огляді літератури* підсумовано сучасні дані про імунопатогенез ревматоїдного артриту, його стадії. Охарактеризовано роль моноцитів/макрофагів, зміни спектру протеїнів плазми крові, а також стан низькомолекулярних медіаторів запальних процесів при прогресуванні РА. Подано характеристику механізмів генерації радикальних процесів за участю продуктів часткового відновлення кисню та оксидів нітрогену та їх ролі у патогенезі РА. Представляють інтерес нові дані про роль сульфїду у регуляції запальних процесів. Важливим підґрунтям для визначення експериментальної методології є опис методологій визначення апоптичної активності та відомих експериментальних тваринних моделей РА. Особливо слід відзначити, що у огляді досить повно акумульовані сучасні погляди на молекулярні основи РА, зокрема присутня інформація про антигістонові антитїла та специфічну роль цитрулін-модифікованих протеїнів у ранній діагностиці РА. До вад огляду слід віднести акцент на використання оглядових праць, що супроводжується згадуванням авторів оригінальних праць, не підкріпленим посиланнями на першоджерела.

У Розділі *«Матеріали і методи досліджень»* висвітлюються експериментальні схеми та подаються використані методи. Варто було об'єднати перелік методів у змістовні блоки та, відповідно, позбутися зайвої рубрикації. Дисертант буквально розуміє під матеріалами перелік реактивів та визначає експериментальні схеми як «Об'єкт дослідження», що не відповідає визначенню «Об'єкту дослідження», поданому у Вступі. Зміст розділу засвідчує високий рівень виконання експерименту, оскільки дисертантом використано коректні умови експерименту та застосовано широкий спектр сучасних біохімічних та цитологічних методів аналізу функціональної активності систем імунного та антиоксидантного захисту та загальноклінічні біохімічні показники. Були використані також морфологічні методи та мікро-магнітно-ядерні дослідження колінного суглоба, про що не йдеться у «Методах», проте їх результати додатково посилили доказову базу.

Розділ *Результати досліджень та їх обговорення* складається з 12 підрозділів, які було б доцільно об'єднати у 3-4 змістовні блоки.

Результати, представлені у підрозділах 3.1–3.4, демонструють достатній рівень інформативності загальних біохімічних показників крові за хронічного та гострого експериментального артриту у тварин та РА у пацієнтів. Підрозділ добре проілюстрований діаграмами, які відображають діапазон відмінностей показників у експериментальних тварин. Результати свідчать, що за більшістю характеристик (аспартаттрансферазна та лужнофосфатазна активність, рівень сечової кислоти) обидві моделі артриту мають подібні прояви, які відображають загальне порушення метаболізму та можуть бути зокрема наслідками гепатобіліарної та остеопатологій. Морфологічні параметри також засвідчують, що експериментальні моделі є коректними. Важливо, що результати електрофорезу протеїнів плазми крові за часткою γ -глобулінів дозволяють диференціювати гострий та хронічний

артрит на відміну від вище зазначених характеристик, що може бути корисним показником при ідентифікації реакції організму як у експериментальних моделях, так і хворих на РА.

У підрозділах 3.5., 3.6. охарактеризовано фагоцитарну активність нейтрофілів та моноцитів у крові експериментальних тварин та пацієнтів з РА. У кожному випадку на стадії загострення та ремісії встановлено зростання концентрації циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові. У щурів відзначено зростання спонтанної фагоцитарної здатності нейтрофілів порівняно з контрольними значеннями (за результатами проточної цитофлуориметрії) та зниження фагоцитарної здатності нейтрофілів, стимульованої *E. coli*. Важливо, що при дослідженні фагоцитарної здатності доведено подібність у відповіді між тваринною експериментальною моделлю та РА як для гострого запалення, так і для хронічного артриту.

У підрозділах 3.7–3.8. повідомляється про здатність нейтрофілів та моноцитів до дихального вибуху у експериментальних тварин та хворих на РА. За допомогою метода проточної цитофлуориметрії із використанням флуоресцентного агента родаміну доведено, що інтенсивність генерації радикалів вища у нейтрофілах та моноцитах у дослідних моделях експериментальних тварин ~ у 2 - 4 рази порівняно з контрольною групою тварин. За впливу хемотаксичного пептиду у експериментальних моделях генерація АФК також інтенсивніша, ніж у контролі, тоді як при використанні як стимулятора *E. coli*, або активатора протеїнкінази С були відсутні відмінності порівняно із контролем. У людини відмінності у активації кисневого вибуху у нейтрофілах та гранулоцитах між групами загалом були подібні до таких у експериментальних моделях, але виражені слабше, а стимуляція *E. coli* призводила до пригнічення цього процесу.

Результати окисного ураження у крові як наслідку кисневого вибуху розглядаються у підрозділах 3.9–3.10. Вони підтверджують розвиток оксидативного стресу в щурів за умов експериментальних запальних процесів за такими ознаками як швидкість генерації супероксидного ($O_2^{\cdot-}$) та гідроксильного ($\cdot OH$) радикалів, гідроген пероксиду (H_2O_2), активності конститутивної та індукцйбельної NO-синтази, вмісту оксидів азоту (IV, VI) (NO_2^- та NO_3^-), та утворення ТБК-активних продуктів у плазмі крові експериментальних тварин. Крім того, у плазмі крові істотно зростає активність аргінази. При обох формах артриту зростає більше як удвічі і вміст сірководню, який є регулятором серцевосудинної активності у плазмі.

У підрозділі 3.11 доводиться, що за гострого артриту кількість апоптичних лімфоцитів зменшується, а за хронічного – зростає порівняно із контролем, як у тварин, так і людини. Дослідження рівню лектин-індукованої аглютинації також дозволило диференціювати пацієнтів з РА та здорових осіб за класом аглютинації пропорційно до частки апоптичних клітин та стадією хвороби. У пацієнтів з РА із загостренням хвороби спостерігалася найбільш виражена аглютинація.

Підрозділ 3.12. присвячений доведенню протеолітичної активності IgG, причому виявлено ензимну специфіку IgG цих тварин проти гістону H1, тоді як IgG неімунізованих тварин таку активність не проявляє. IgG імунізованих тварин проявляв також активність до основного протеїну мієліну (ОПМ), проте не до альбуміну сироватки бика та казеїну. Цей механізм абзимної активності підтверджується і в іншій тваринній моделі – у мишей лінії BALB/c, у яких хронічне запалення індукується імунізацією гістонами тимуса теляти. Більше того, показано, що хроматографічно очищені IgG-антитіла гідролізують корові гістони тимуса теляти, та встановлено кінетичні параметри цієї реакції. Протеолітично активні антитіла з подібною субстатною специфічністю були виявлені також у сироватці крові хворих на РА. На продовження цих досліджень та у відповідності із інформацією у Огляді літератури було би доречно здійснити пошук антитіл, спрямованих на цитрулін, які вважаються ознакою ранніх стадій РА та маркером ефективності терапії.

У Розділі *«Обговорення результатів дослідження»* автор констатує отримані результати та зазначає, що механізм виникнення та розвитку імунозапальних реакцій у хворих на РА залишається остаточно нез'ясованим, ґрунтуючись на роботах (Sewell K. I., Trentham D. E., 1993; Артеменко Н. А., Сизякина Л. П., 1997). Поряд з цим, поза увагою дисертанта залишились такі ґрунтовні сучасні огляди молекулярних основ РА як Weyand and Goronzy, 1997; Smith and Hayes, 2002; Zhang et al., 2006. На підставі отриманих результатів із використанням сучасних методів дисертант доводить, що експериментальні моделі колагенового, та ад'ювант-індукованого артритів є коректними для вивчення механізмів розвитку РА.

Автор формулює вісім **висновків**, які відображають сутність отриманих результатів та влучно komponують матеріал, що полегшує порівняння реакцій у тваринній моделі та у хворих на РА у гострій чи хронічній формі.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій. Сформульовані положення та висновки ґрунтуються на експериментальних даних, отриманих з дотриманням стандартних вимог до відбору проб, на достатній кількості повторностей в експерименті і одночасному проведенні вимірів в контрольній групі та групах, які піддавалась дії досліджуваного чинника. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже, ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

Недоліки по змісту і оформленню:

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є ряд питань дискусійного характеру, рекомендацій та зауважень до стилю і оформлення.

1. З формулювання завдань 2 і 3 незрозуміло їх відмінності, оскільки «особливості перебігу оксидативних реакцій ...» можуть бути охарактеризовані за «вмістом метаболітів оксиду нітрогену... та продуктів перекисного окиснення ліпідів».

2. У огляді літератури та обговоренні результатів дисертант посилається на авторів досліджень, проте не подає інформацію про ці роботи у Списку

використаних джерел, наприклад про оригінальні роботи Silva (С.16), Burmester G. R. et al. та Heller R.A. et al. (С 19), K. Kakimoto та співр. (с 21), Mitchell та Cheesman (С 23), тощо.

3. Викликає сумнів адекватності оцінки рівнів генерації ОН-радикалу ...за приростом малонового діальдегіду [144 – Humphries et al. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal // Bioch. – (насправді Biochemistry. 1998)]. У даній роботі, що стосується впливу проміжного продукту ПОЛ на інтактні мітохондрії, не міститься доведення того, що утворення ТБК-АП пропорційне генерації ОН. Крім того, у дисертації використано інформативний метод оцінки дихального вибуху за флуоресценції, що робить зайвим працемістке визначення окремих АФК, а відмінності у діапазоні їх змін, зокрема з огляду на особливу роль Гідроген пероксиду у функції лімфоцитів, не дістали належного обговорення.

4. Запитання до діагностичної цінності визначення активності у плазмі крові внутрішньоклітинних ензимів NO-синтаз, аргінази.

5. Зауваження до термінології: С. 23 «відновлює молекулярний оксиген...»; споживання оксигену(с 71), у описі методик: «Обстеження проводили на автоматичному аналізаторі (с 38 і далі у Методах), «Вимірювання лужної фосфатази (очевидно активності, с 40), «папір, намочили», «20 мкл бактеріями», с 42 - у третю – хемотаксичного пептиду С 61 - «незначне зниження фракції альбумінів»; С 73 «достовірні зміни ... між експериментальними дослідними групами» – насправді не зміни, а відмінності.

6. Зауваження до вимірів: (С. 87) рівень сірководню ($207,34 \pm 37,48$ нмоль/мл), насправді, був виражений, очевидно, у нмоль/л. На Рис. 3.9.2. по шкалі ординат позначено концентрацію NO-синтази - насправді це активність. Крім того недоречно подавати на графіку загальну активність як суму двох складових, якщо подається активність кожної форми; табл 3.1.2 та с. 7 реферату – некоректні одиниці вимірів – мкМ/л, мМ/л; табл 3.1.1, 3.9.3 та табл 1, 7 реферату – завищений рівень точності цифрових виразів; табл 3.9.1. та табл 4 Реферату: Швидкість генерації АФК у плазмі у одиницях на мг (чого?)

7. У Рефераті не вказано, чим стимулювали нейтрофіли (Рис. 1,2).

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. Дисертація відповідає вимогам МОН України. Результати проведених автором досліджень повністю відображені у публікаціях. Зміст автореферату відображає структуру і положення дисертації, які виносяться на захист.

За темою дисертації опубліковано 7 статей, в т.ч. 6 – у фахових вітчизняних та міжнародних журналах, і 6 тез доповідей на наукових конференціях.

В цілому дисертація І.Й. Кріль є завершеною роботою, яку відзначає послідовність і цілеспрямованість у вирішенні конкретного питання біохімії – встановленні молекулярних проявів ураження на імунозапальний артрит на різних стадіях захворювання у плазмі крові. Одержані результати відкривають нові можливості для з'ясування шляхів діагностики та корекції

ревматоїдного артрити у людини. Результати репрезентовані на достатній кількості наукових зібрань та у публікаціях належного рівня. Висновки відповідають поставленим завданням і повністю відображають одержані результати. Автореферат дисертації відповідає встановленим вимогам.

На основі вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота **Кріль Ірини Йосифівни «Біохімічні та імунологічні зміни у крові за умов імунозапального артрити»**, за актуальністю проблеми, методичними підходами, зробленими висновками, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів є завершеною науковою працею і відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою N 526 Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 стосовно кандидатських дисертацій за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Професор кафедри хімії
та методики її навчання
Тернопільського національного
педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка
доктор біологічних наук

О.Б. Столяр

4.01.2016 р.