

Голові разової
спеціалізованої вченої ради
Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна
професору Бересту В.П.
майдан Свободи 4, м. Харків, 61022

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, доцента кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, кандидата біологічних наук, доцента Авксентьевої Ольги Олександрівни на дисертаційну роботу Биченко Катерина Олексіївни на тему «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»

1. Обґрунтування вибору теми дослідження.

Дослідження біології розвитку стадій запального процесу як системної захисної реакції організму, що розвивається на всіх рівнях його організації має вагомий фундаментальний та практичний інтерес. За сучасності для корекції стадій хронічного запального процесу окрім медикаментозних використовують різноманітний спектр екзогенних факторів впливу на базі досягнень медико-біологічних досліджень. Перспективним напрямом є використання дії світла – фотоопромінення спектром певної довжини хвилі. Світло сприяє активації мікроциркуляції у клітині, у тому числі, за рахунок активації мембранного транспорту та впливає на різноманітні метаболічні шляхи. Для корекції імунометаболічних порушень також застосовують стовбурові клітини та їх метаболіти, в тому числі для корекції важких метаболічних дисфункцій – локальних та системних запальних реакцій. В той же час мало досліджень, присвячених вивченню впливу екзосом (в якості біологічного фактору), які містять екзометаболіти стовбурових клітин різного походження, фактори росту та інші фактори мікрооточення на

хронічне запалення. Крім світлового впливу, стовбурових клітин також застосовують різні наночастинки для підтримки редокс-системи клітин і мікроциркуляції. Наночастинки різного походження в тому числі діоксин церію, можуть виконувати транспортну функцію, проникати крізь біомембрани та змінювати функції біомолекул. Однак, через суперечливі відомості про цитотоксичність наночастинок, їх застосування супроводжується постійною дискусією про можливі механізми їхньої дії на динаміку локальних та системних запальних процесів.

Отже, використання комплексної дії факторів різноманітної природи – фізичних, хімічних та біологічних (фотоопромінення спектром різної довжини хвилі, вплив екзосом стовбурових клітин та дія наночастинок церію) може бути перспективним напрямом для фундаментальних теоретико-біологічних досліджень та практичного застосування у терапії запального процесу.

2. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому і оформлення

Дисертація Биченко Катерини Олексіївни «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» є завершеною науково-дослідною роботою, в якій вирішений комплекс завдань, пов'язаних з дослідженням біології та корекції запального процесу з використанням сучасних напрямів біологічної науки – фотобіології, клітинних технологій *in vitro* та нанобіотехнологій. Результати досліджень повністю висвітлені у наукових публікаціях, матеріалах конференцій та відображені у змісті дисертації.

Дисертаційна робота виконана на базі кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна та Інституту загальної та невідкладної хірургії імені В.Т. Зайцева НАМН України. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків та списку цитованої літератури. Дисертацію викладено на 178 сторінках машинного тексту, вона містить 45 рисунків та 6 таблиць, 215 посилань на літературні джерела.

У першому розділі дисертаційної роботи представлено аналітичний огляд сучасного стану досліджень стосовно обраної тематики, а саме основних етапів перебігу та розвитку запального процесу на рівні імунологічних та метаболічних змін; аспектів фотобіології та дії саме спектральної складової світла на різноманітні біологічні об'єкти – мікроорганізми, рослинні та тваринні організми; особливості дії екзосом стовбурових клітин та характеристика біологічних властивостей наночастинок діоксину церію.

У другому розділі наведено та охарактеризовано три експериментальні моделі дослідження - модель тривалого запального процесу на тваринах з індукованим перитонітом для оцінки ефектів фотоопромінювання тварин різними довжинами хвиль ($\lambda = 660$ нм, 530 нм, 470 нм) на різних етапах запального процесу; культура лейкоцитів периферичної крові *in vitro* для застосування екзосом з метаболітами стовбурових клітин та модель біоіндикаторної тест-система - культури одноклітинної водорості *Dunaliella viridis* для дослідження цитотоксичної активності наночастинок діоксиду церію. Також представлено детальна характеристика всіх методів дослідження, використаних у роботі – біотехнологічних, імунологічних, біохімічних та статистичних.

У третьому розділі дисертаційної роботи представлено результати досліджень згідно трьох експериментальних моделей. Фотобіологічні дослідження ефектів після світлового впливу різних довжин хвиль на стадії запального процесу та регенерації у експериментальних тварин з індукованим ЛПС-перитонітом; результати досліджень проліферативного потенціалу лейкоцитів (від пацієнтів з довготривалим запальним процесом) в культурі *in vitro* та результати вивчення цитотоксичності наночастинок церію з використанням клітинного біоіндикатору *D. viridis*.

Представлено розділ з *обговорення результатів*, де проведено узагальнення досліджень згідно трьох експериментальних моделей та вивчення комплексної дії факторів фізичної, хімічної та біологічної природи на стадії розвитку та регенерації запального процесу. *Висновки* дисертаційної роботи підкреслюють наукову новизну та практичну значущість проведених досліджень.

Список використаних джерел свідчить про проведення дуже ретельного аналізу результатів сучасних наукових досліджень світових наукових центрів та наукових шкіл згідно тематики роботи.

Оформлення, зміст, структура дисертації та кількість публікацій відповідають вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. No 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. No 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

3. Найвагоміші наукові результати, представлені в дисертації:

Основні результати дисертації добре обґрунтовані і проаналізовані автором, підкріплені експериментальним дослідженням із використанням різноманітних моделей дослідження на різних рівнях організації живої матерії. Достовірність отриманих результатів не викликає сумнівів. Результати дослідження та основні положення дисертаційної роботи були представлені, апробовані та отримали позитивну оцінку на міжнародних та Всеукраїнських наукових конференціях. За матеріалами дисертаційної роботи було опубліковано 23 наукових праць, з них 5 статей у фахових виданнях, 1 – у журналі, індексованому в наукометричній базі Scopus, 15 тез доповідей та 2 публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації. Матеріали дисертаційного дослідження були представлені та пройшли апробацію на 15 наукових конференціях, причому значна частина - це міжнародні закордонні конференції, які проходили у Фінляндії, США, Угорщині, Болгарії, Греції, Великобританії, Канаді.

Наукова новизна одержаних результатів заключається у наступному:

1. Вперше показано, що фотоопромінення різними довжинами хвиль ($\lambda = 660$ нм, 530 нм, 470 нм) призводило до різних ефектів на певні етапи запального процесу: від активації до інгібування показників імунітету що, у свою чергу, впливало на тривалість термінів процесу запалення.

2. Встановлено стимулюючий ефект екзосом, що містять екзометаболіти мезенхімальних стовбурових клітин, який проявлявся в

збільшенні проліферативної активності *in vitro* у культурі клітин пацієнтів із хронічним запаленням.

3. Проведений аналіз на цитотоксичність наночастинок церію з використанням тест-культури *D. viridis* за різними показниками – розмір, концентрація та ін. Доведено, що наночастинок діоксиду церію малого розміру (2 нм) в концентрації 0,1 М не проявляли цитотоксичної дії.

4. Наукове, теоретичне та практичне значення результатів дисертації.

Результати проведених досліджень мають вагомим теоретичним та фундаментальним значенням в розвитку теорії запалення, характеристики імунорезистентності на певних стадіях розвитку та регенерації запального процесу, в розвитку інтегральної біологічної дисципліни – фотобіології, розвитку сучасних аспектів нанобіотехнології та особливостей культивування стовбурових клітин *in vitro* та використання сучасних клітинних технологій.

Результати отримані в ході дисертаційного дослідження є підґрунтям для обґрунтування імунологічних механізмів біологічних ефектів після фотоопромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення; оцінки дії екзосом стовбурових клітин як активаторів проліферативного потенціалу в культурі клітин *in vitro* та дають можливість моніторити ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками.

Практичне значення отриманих результатів полягає у тому, що визначені особливості вибіркової дії фотоопромінювання, активуючий вплив екзосом стовбурових клітин та використання наночастинок церію як цитопротекторів можуть служити біологічною основою для розробки показань до їх спільного застосування для корекції імунометаболічних показників при хронічних запальних реакціях.

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

На основі тексту дисертації та наукових публікацій Биченко К.О. можна стверджувати, що результати, представлені в дисертації, обґрунтовані, достовірні та повністю відповідають меті і завданням дисертаційної роботи. Обґрунтованість і достовірність представлених результатів забезпечується:

- застосуванням трьох експериментальних моделей дослідження, за якими проведено достатню кількість серій експериментів;
- використанням статистичних методів аналізу результатів дослідження;
- аналізом та порівнянням отриманих результатів з сучасними дослідженнями інших авторів світових наукових центрів проведених за тематикою дослідження;
- публікацією результатів дисертаційного дослідження в фахових наукових виданнях (втому числі, що індексуються у наукометричній базі Scopus);
- чисельною апробацією отриманих результатів дисертаційного дослідження на міжнародних наукових та науково-практичних конференціях.

6. Дотримання академічної доброчесності та оформлення дисертації.

За результатами аналізу дисертаційної роботи та публікацій автора, протоколу контролю оригінальності (перевірку можливої наявності текстових запозичень виконано в інтернет-системі Strikeplagiarism.com), порушення академічної доброчесності не виявлено. Елементи фальсифікації чи фабрикації тексту в роботі відсутні. Дисертація Биченко Катерина Олексіївни на тему «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» відповідає всім вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії...», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 (із змінами, внесеними згідно з Постановою КМ № 341 від 21 березня 2022 р.). Дисертація оформлена згідно з вимогами Наказу МОН України від 17.01.2017 року № 40.

7. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна «Розробка біосумісних імплантатів кісткової тканини і шкіри та використання електромагнітного випромінювання оптичного діапазону спектра для оптимізації процесів регенерації» (№ держреєстрації 0116U000816), «Розробка мобільних фототерапевтичних апаратів для профілактики та лікування синдрому діабетичної стопи» (№ держреєстрації 0118U0002029) та

ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В.Т. Зайцева НАМН України «Вивчити молекулярні механізми перебігу раньового процесу з огляду на процеси п'єзобіосинтезу та розробити нові методи лікування ран з використанням комбінованих покривних матеріалів» (№ держреєстрації 0118U000015).

8. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.

Принципових і суттєвих зауважень до роботи не виникло, всі розділи оцінені позитивно. Мета наукової роботи досягнута, і усі завдання виконані у повному обсязі. Є окремі зауваження щодо оформлення результатів дослідження. Також були виявлені технічні та стилістичні помилки.

Проте, наведені зауваження жодним чином не зменшують якість дисертації та обґрунтованість висновків, зауваження не є принциповими і в цілому, не знижують загальний високий рівень даної дисертаційної роботи.

В межах наукової дискусії хотілося б підняти такі питання:

1. В роботі відповідно до третьої експериментальної моделі дослідження проведено та представлено результати значного обсягу експериментів стосовно визначення ступеню цитотоксичності наночастинок церію за багатьма критеріями – вільний стан чи в у вигляді оксиду, розмір наночастинок, концентрація, взаємодія з сироваткою. Визначено оптимальні показники за цитотоксичністю для наночастинок церію для їх подальшого використання. Але з тексту дисертаційної роботи не зрозуміло, чи проводились попередні дослідження з визначення впливу наночастинок церію як цитопротекторів, антиоксидантів та активаторів мікроциркуляції для корекції запального процесу. На якій стадії хронічного запального процесу ефективніше використовувати комплексну дію фотоопромінювання та наночастинок церію?

2. В тексті дисертаційної роботи постійно вживаються терміни запальний процес, запальна реакція, хронічний, локальний, індукований, модельний запальний процес – можливо було б доцільно надати визначення цим термінам, провести їх диференціацію та внести у список скорочень.

3. В тексті роботи є невелика кількість технічних зауважень: описок, стилістичних помилок, та так званих «русизмів», помилки стосовно нумерації у додатку А.

Ці дрібні зауваження жодним чином не впливають на якість результатів дисертаційної роботи і обґрунтованість наведених здобувачем висновків.

9. Загальні висновки.

За актуальністю і новизною отриманих результатів, їх рівнем, обсягом, достовірністю та обґрунтованістю, фундаментальним, теоретичним, науковим і практичним значенням та їх оформленням, дисертаційна робота Биченко Катерина Олексіївни «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» за спеціальністю 091 – «Біологія» повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» є повністю завершеною, самостійною науковою працею.

Вважаю, що Биченко Катерина Олексіївна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний рецензент,
доцент кафедри молекулярної біології
та біотехнології Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна
кандидат біологічних наук, доцент

Ольга АВКСЕНТЬЄВА

Підпис Ольги Авксентьєвої засвідчую
Начальник відділу кадрів
Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна

Олена ГРОМИКО

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 13:43:15 26.12.2023

Назва файлу з підписом: Рецензія_Авксентьева 25.12.2023.pdf.asics
Розмір файлу з підписом: 359.8 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Рецензія_Авксентьева 25.12.2023.pdf
Розмір файлу без підпису: 341.0 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Авксентьева Ольга Олександрівна

П.І.Б.: Авксентьева Ольга Олександрівна

Країна: Україна

РНОКПП: 2343924446

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 13:38:33
26.12.2023

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF970400000029DCCF00E7A2C801

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в CMS-файлі (CAAdES)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований

Голові разової
спеціалізованої вченої ради
Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна
професору Бересту В.П.
майдан Свободи 4, м. Харків, 61022

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, старшого дослідника, провідного наукового співробітника лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», Книш Оксани Василівни на дисертаційну роботу **Биченко Катерини Олексіївни** з теми **«Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення»**, подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Обґрунтування вибору теми дослідження. Необхідність пошуку нових ефективних методів впливу на довготривале хронічне запалення стає дедалі гострішою. Для вирішення такої складної проблеми біології та медицини, якою є корекція довготривалих запальних реакцій, на практиці використовують різні підходи. Подолання ускладнень хронічного запалення може бути досягнуте за допомогою розроблення нових або вдосконалення існуючих комплексних підходів, таких як: створення протимікробних препаратів, вакцин та комплексних біологічних препаратів, що забезпечують формування імунітету проти інфекцій, спричинених конкретними збудниками екзогенного або ендогенного походження. Відомо, що адресна імунокорекція з використанням клітинної терапії і факторів росту, а також

застосування фізичних методів у комплексі з деякими хімічними сполуками, є ефективними при лікуванні локальних та генералізованих запальних процесів. Але механізми дії цих чинників на біологічні системи залишаються недостатньо дослідженими. Для підвищення ефективності застосування таких комплексних методів необхідним є вивчення діапазону їх вибіркової дії та можливої цитотоксичності.

На сьогодні немає єдиної думки щодо рівня ефективності і механізмів дії фотоопромінювання з використанням різних довжин хвиль видимого діапазону при корекції локальних та системних запальних процесів. Проте, як підтверджують результати багатьох досліджень, доцільність і необхідність впровадження у практику таких методів лікування в подальшому не викликає сумнівів. Тому питання вивчення і уточнення механізмів впливу світла видимого діапазону спектру з різними довжинами хвиль на запальні процеси безсумнівно є актуальними. В роботі автором переконливо доведена наявність позитивного ефекту фотоопромінювання на імунологічні механізми при експериментальному моделюванні запалення.

З'ясування механізмів комплексного впливу різних факторів на імунореактивність та імунорезистентність, які є складовими регуляторної системи організму в умовах запального процесу, представляє як науковий, так і практичний інтерес. У роботі Биченко К.О. мета та задачі сформульовані чітко. Назва роботи відповідає поставленим меті та задачам. Методи, використані в дисертаційній роботі, є сучасними та достатніми для досягнення мети.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах науково-дослідних робіт Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Розробка біосумісних імплантатів кісткової тканини і шкіри та використання електромагнітного випромінювання оптичного діапазону спектра для оптимізації процесів регенерації» (№ держреєстрації 0116U000816), «Розробка мобільних фототерапевтичних апаратів для профілактики та

лікування синдрому діабетичної стопи» (№ держреєстрації 0118U0002029) та ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В.Т. Зайцева НАМН України «Вивчити молекулярні механізми перебігу ранового процесу з огляду на процеси п'єзобіосинтезу та розробити нові методи лікування ран з використанням комбінованих покривних матеріалів» (№ держреєстрації 0118U000015).

Загальна характеристика дисертаційної роботи. Дисертаційна робота виконана в Науково-дослідному інституті біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна та на базі діагностичної лабораторії з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України». Складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків та списку цитованої літератури. Дисертацію викладено на 178 сторінках машинного тексту, вона містить 45 рисунків та 6 таблиць, 215 пунктів цитованої літератури.

Перший розділ присвячений огляду літературних джерел з теми дисертаційного дослідження: розглянуто патофізіологічні зміни, що розвиваються в клітинах і тканинах на різних стадіях розвитку запального процесу, та чинники, які впливають на перебіг запалення; описані відомі ефекти впливу світла різних діапазонів на молекулярному, клітинному та тканинному рівнях, зокрема за умов розвитку запалення. Представлено дані сучасної літератури в галузі клітинної біології, а саме описано результати застосування стовбурових клітин різного походження та їх метаболітів, які містяться у екзосомах і з успіхом застосовуються для корекції імунометаболічних порушень при різних патологіях. Значна частина огляду літератури присвячена висвітленню останніх досягнень у сфері дослідження корисних (цитопротекторних, антиоксидантних, антирадикальних, антиапоптотичних) і шкідливих (цитотоксичних, прооксидантних,

апоптогенних) властивостей наночастинок при їх застосуванні на тваринних моделях або у разі патологічних станів та захворювань.

У другому розділі дисертації розглянуто використані матеріали (експериментальні тварини, сироватка та формені елементи крові пацієнтів з хронічним запаленням, культура одноклітинної водорості *Dunaliella viridis* як біоіндикаторна тест-система, солі та наночастинок церію, суспензія екзосом стовбурових клітин (МСК) плаценти) і методи (імунологічні, оптичні, спектрофотометричні, статистичні), описано дизайн експериментального дослідження, а саме три експериментальні моделі. Перша модель застосована для вивчення впливу світла різних довжин хвиль видимого діапазону на імунологічні показники у експериментальних тварин з індукованим запальним процесом. Друга модель – для вивчення стимулюючої дії екзосом на проліферативну активність клітин в культурі. За допомогою третьої моделі вивчали цитотоксичну дію наночастинок церію різного розміру і концентрації з використанням клітинного біоіндикатора *D. viridis*.

У третьому розділі представлено результати досліджень: зміни фізіологічних параметрів та імунологічних показників вродженого імунітету у експериментальних тварин після впливу світла різних довжин хвиль ($\lambda = 660$ нм, 530 нм, 470 нм,) на різних етапах запального процесу у експериментальних тварин; зміни проліферативної активності в культурі лейкоцитів периферичної крові пацієнтів з хронічним запаленням після введення екзосом в культуральну систему; визначено, наночастинок діоксиду церію якої молекулярної маси і концентрації не володіють цитотоксичністю, а отже можна вважати безпечними для практичного використання. Автором також представлено результати комплексного лікування пацієнтів з трофічними ранами гомілки (фотодинамічна терапія, екзосоми та наночастинок, нанесені на штучне покриття ран) відповідно до їх «інформованої згоди». В кінці розділу автор досить чітко узагальнює результати проведених досліджень.

У четвертому розділі представлено обговорення і оцінку отриманих результатів. Автор обґрунтовує позитивний ефект від застосування досліджених фізичних, біологічних і хімічних факторів та доцільність їх використання в медичній практиці на певних стадіях хронічних запальних процесів для скорочення строків лікування і ефективного загоєння ран.

Висновки дисертаційної роботи чітко сформульовані і підкреслюють наукову новизну проведених досліджень.

Найвагоміші наукові результати, представлені в дисертації: Запропоновано алгоритм комбінованого методу застосування фізичних, біологічних та хімічних чинників для практичного використання під час корекції стадій запальної реакції, які сприяють поліпшенню мікроциркуляції, підвищенню біоенергетичного потенціалу та активності клітинних мембран при хронічному запальному процесі.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. На основі вивчення тексту дисертації та змісту публікацій Биченко К.О. можна стверджувати, що результати, представлені в дисертації, обґрунтовані, достовірні та відповідають меті і завданням дисертаційної роботи. Обґрунтованість і достовірність представлених результатів забезпечується:

- застосуванням надійно перевірених теоретичних моделей та статистичних методів до найновіших спостережних даних;
- систематичним порівнянням отриманих результатів із сучасними дослідженнями інших авторів;
- публікацією результатів дисертаційного дослідження в наукових виданнях найвищого рівня;
- достатньою апробацією отриманих результатів на наукових конференціях.

Апробація дисертації та публікації. Результати роботи опубліковані у 9 статтях, одна з яких – у виданні, що індексується міжнародною наукометричною базою Scopus. Основні положення і результати роботи

доповідалися на 15 науково-практичних конференціях, що дозволяє вважати апробацію результатів дисертаційної роботи достатньою.

Оформлення дисертації. Оформлення, зміст, структура дисертації та кількість публікацій відповідають вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

Наукове, теоретичне та практичне значення результатів дисертації. Проведені дослідження дозволили: обґрунтувати деякі механізми дії фотоопромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення; оцінити дію екзосом стовбурових клітин як активаторів проліферативного потенціалу в культурі клітин та з'ясувати ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками для розробки показань до їх спільного застосування. Дослідження змін механізмів імунорезистентності після дії різних довжин хвиль видимого діапазону на етапи запального процесу сприяє розробці показань до їх застосування. Виявлена активація проліферації клітин у культурі після впливу екзосом стовбурових клітин може бути використана як індуктор репарації при запаленні. Наночастинки діоксиду церію малих розмірів у низькій концентрації, які не проявляють цитотоксичності, можуть використовуватися у вигляді цитопротекторів, антиоксидантів та активаторів мікроциркуляції на стадії альтерації запального процесу.

Зауваження щодо структури, змісту роботи та оформлення дисертації.

1. Текст дисертації, особливо Розділ 4 «Обговорення результатів» перевантажений громіздкими, складними для сприйняття реченнями, які можна було б спростити або розділити на декілька простих та зрозумілих.

Також текст містить невелику кількість калькованих конструкцій, замість яких доцільніше було б вживати українські відповідники.

2. У розділі «Матеріали і методи» бажано було б надати:

a) посилання на більш новий міжнародний нормативний документ, «Директиву Євросоюзу 2010/63/ЄС з охорони тварин, які використовуються в експериментальних та інших цілях»;

b) назву оптичного приладу, за допомогою якого проводили мікроскопічні дослідження;

c) більш детальний опис способу виявлення однієї з ознак цитотоксичного ефекту, яку враховували при розрахунку коефіцієнтів цитотоксичності солей та наночастинок церію – «виділення екзометаболітів».

3. Слід зазначити, що автором застосовано загальноприйнятий, адекватний поставленим задачам метод оцінки фагоцитарної активності нейтрофілів за фагоцитарним індексом (характеризує інтенсивність фагоцитозу), фагоцитарним числом (характеризує поглинальну здатність) та індексом завершеності фагоцитозу (характеризує перетравлюючу здатність). Однак при прочитанні параграфа 2.5 «Фагоцитарна активність нейтрофілів в кисненезалежному фагоцитозі» (с. 68) недостатньо зрозумілими здаються твердження: *«фагоцитарну активність нейтрофілів визначали за хемотаксисом, адгезією і ендоцитозом антигену»*; *«хемотаксис оцінювали за показником фагоцитарного індексу»* та *«ендоцитоз оцінювали за показником індексу завершеності фагоцитозу»*, які бажано було б пояснити і розширити при подальшому описі та обговоренні результатів дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів.

Виявлені недоліки здебільшого технічного характеру жодним чином не зменшують теоретичну та практичну значущість отриманих автором результатів і не мають значного впливу на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Загальний висновок

Вважаю, що дисертаційна робота Биченко Катерини Олексіївни «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017.р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій». Вважаю, що Биченко Катерина Олексіївна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» – за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент,

доктор медичних наук, старший дослідник,
провідний науковий співробітник
лабораторії та клінічного відділу
молекулярної імунофармакології Державної
установи «Інститут мікробіології та
імунології ім. І. І. Мечникова Національної
академії медичних наук України»

Оксана КНИШ

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 11:30:23 26.12.2023

Назва файлу з підписом: відгук Книш О.В..docx.asice
Розмір файлу з підписом: 43.9 КБ

Назва файлу без підпису: відгук Книш О.В..docx.asice
Розмір файлу без підпису: 43.9 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: КНИШ ОКСАНА ВАСИЛІВНА

П.І.Б.: КНИШ ОКСАНА ВАСИЛІВНА

Країна: Україна

РНОКПП: 2663517649

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 13:03:07
25.12.2023

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F040000007E6E2E012CA08E04

Тип носія особистого ключа: Незахищений

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Удосконалений

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Голові разової
спеціалізованої вченої ради
Харківського національного
університету імені В.Н.
Каразіна
професору Бересту. В.П.

майдан Свободи 4, м. Харків,
61022

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора сільськогосподарських наук, професора Іонова Ігоря Анатолійовича на дисертаційну роботу Биченко К.О. **«Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення»**, подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» – за спеціальністю 091 – «Біологія».

Обґрунтування вибору теми дослідження. Біологічна роль запалення, що сформувалася в процесі еволюції, полягає в інфільтрації вогнища запалення та спрямована на активацію флогогенного фактору з організму, а також у відновленні структури та функції пошкодженої тканини. Однак тривалі запалення призводять до великого пошкодження тканин і клітин, що в свою чергу порушує стабільність перебігу запального процесу і призводить до хронізації процесу. Лікування запальних процесів, що характеризуються хронічними запаленнями, в даний час складні проблеми медицини.

В даний час для лікування ран використовують різні методи стимуляції репаративного процесу, такі як електростимуляція, ультразвукова терапія, азонотерапія та інші. Незважаючи на таке розмаїття та позитивні результати, більшість з методів лікування вимагає подальших досліджень механізмів, що впливають на процеси загоєння ран. В даній роботі була застосована фотобіомодуляційна терапія. Ця терапія є одним з новітніх методів, що демонструє багатообіцяючі результати. В цій формі світлотерапії використовуються неіонізуючі форми джерел світла, включаючи лазери,

світлодіоди та широкосмугове світло у видимому та інфрачервоному спектрі. Використання цього методу може приводити до модулювання запалення, стимуляції проліферації фібробластів та ангиогенезу, і, отже, рекомендовано до застосування для поліпшення загоєння ран.

Також важлива проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів до багатьох препаратів, які успішно застосовували для лікування різних запалень та сепсису. У зв'язку з цим ведеться пошук нових методів корекції впливу на мляві запальні стани за допомогою розробки нових або вдосконалення існуючих комплексних підходів, таких як: створення антибактеріальних ліків, вакцин та біологічних композитних препаратів, що забезпечують активний імунітет проти інфекцій, що викликаються конкретними інфекційними антигенами PAMP та екзогенного та ендогенного походження токсичними молекулами DAMP.

Дисертацію присвячено з'ясування проблеми впливу факторів середовища на динаміку запального процесу та відкриття гуморальних та клітинних ланок імунітету на фізичні та біологічні фактори, що застосовуються при лікуванні хворих з локальними та системними запаленнями для вирішення цих питань були застосовані три експериментальні моделі. Автор вивчив вплив різних довжин хвиль світла на індукований експериментальний запальний процес та на імунологічні показники різних стадій довгострокового запального процесу. Також у роботі визначили можливу цитотоксичну дію наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками розмірів та концентрацій.

У роботі автором вивчено і доведено позитивний ефект фізичних, хімічних та біологічних факторів на імунологічні порушення на експериментальні моделі запалення. З'ясування механізмів впливу цих факторів у комплексі на імунореактивність та імунорезистентність, що становлять регуляторну систему організму, в умовах запального процесу безперечно представляє науковий та практичний інтерес.

Сучасні методи діагностики патологічних процесів зазвичай направлені на виявлення маркерних сполук. Можливе визначення дуже широкого спектру таких молекул, але виконання комплексу сучасних методів може займати досить багато часу. До того ж мало інформації про визначення всієї сукупності цитотоксичних факторів сироватки крові при первинних обстеженнях, при визначенні впливу фармацевтичних препаратів на організм людини при складанні схеми лікування в кожному окремому випадку. Тому актуальним є впровадження нових підходів до вирішення проблеми комплексного визначення цитотоксичних факторів організму.

Використання тест-системи на основі водорості *Dunaliella viridis* є швидким у виконанні такого аналізу, економічно обґрунтовано. Як відомо, первинним бар'єром на шляху дії цитотоксичних факторів є мембрана клітин. Відсутність клітинної стінки у представників *D. viridis* робить клітини цього біоіндикатору досить чутливими до різних цитотоксичних факторів, що забезпечує можливість використання їх для скринінгу біологічної рідини.

Мета роботи сформульована добре і відповідно до замислу і назви роботи та відображає основну ідею дослідження. Задачі роботи сформульовані таким чином, що вони передбачають проведення роботи в декілька етапів, що і було зроблено автором. Назва роботи відповідає поставленим цілям та завданням. Задачі охоплюють низку питань, які успішно вирішуються в межах трьох експериментальних моделей. Методи, що використовуються в дисертаційній роботі, є сучасними та достатніми для досягнення мети.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Розробка біосумісних імплантатів кісткової тканини і шкіри та використання електромагнітного випромінювання оптичного діапазону спектра для оптимізації процесів регенерації» (№ держреєстрації 0116U000816), «Розробка мобільних фототерапевтичних апаратів для профілактики та лікування синдрому діабетичної стопи» (№ держреєстрації 0118U0002029) та ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В.Т. Зайцева НАМН України «Вивчити молекулярні механізми перебігу ранового процесу з огляду на процеси п'єзобіосинтезу та розробити нові методи лікування ран з використанням комбінованих покривних матеріалів» (№ держреєстрації 0118U000015).

Загальна характеристика дисертаційної роботи. Дисертаційна робота виконана в Науково-дослідному інституті біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна та на базі діагностичної лабораторії з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України» та складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків та списку цитованої літератури. Дисертацію викладено на 178 сторінках машинного тексту, вона містить 45 рисунків та 6 таблиць, 215 пунктів цитованої літератури.

У першому розділі представлено огляд літературних джерел, описані біологічні ефекти світлового впливу на різні біологічні об'єкти. Представлено дані сучасної літератури в галузі клітинної біології, а саме описано результати застосування стовбурових клітин різного походження та їх метаболітів, які містяться у екзосомах і з успіхом застосовуються для корекції імунометаболічних порушень при різних патологіях. Перший розділ огляду літератури присвячений останнім досягненням у сфері використання різних наночастинок в медичній практиці і вивченню можливих негативних впливів на біооб'єкти. В огляді літератури автор детально розглядає можливі цитотоксичні фактори організму, які можуть з'являтися при розвитку різних патологічних процесів в організмі. Також розглянуто механізми дії цитотоксичних сполук на клітини організму. Окремий розділ присвячено використанню тест-систем для оцінки цитотоксичності.

У другому розділі дисертації розглянуто використані матеріали (експериментальні тварини, сироватка та формені елементи крові пацієнтів з хронічними запаленням) і методи досліджень. Для вирішення поставлених задач дисертант використав стандартні сучасні методи дослідження – спектрофотометрія, колориметрія, світлова мікроскопія, а також параметричні та імунологічні методи. Також в цьому розділі наведено удосконалений метод біоіндикації з використанням тест-системи *Dunaliella viridis*, метою якого є автоматизований розрахунок інтегральних показників для визначення ступеня цитотоксичності сироватки крові.

Матеріали і методика досліджень викладені детально, що дозволяє чітко уявити як проводились досліди.

В роботі описано дизайн експериментального дослідження, а саме три експериментальні моделі, на яких дисертант вивчав дії різних довжин хвиль видимого діапазону на імунологічні показники у експериментальних тварин з індукованим запальним процесом. Друга модель - використання стимулюючої дії екзосом на проліферативну активність клітин в культурі. За допомогою третьої моделі з використанням клітинного біоіндикатора *Dunaliella viridis* вивчали цитотоксину дію наночастинок церію з різними характеристиками (розмір та концентрація наночастинок).

Актуальним для сучасної експрес-діагностики та прогнозу ефективності терапії є впровадження індексу цитотоксичності, який є інтегральним показником дії цитотоксичних факторів на клітини *D. viridis* і враховує як спонтанні зміни клітин в контрольній культурі, так і морфо-функціональні зміни клітин *D. viridis* після дії на них певної сироватки крові. Тобто можна говорити про прогностичні властивості інтегрального індексу цитотоксичності.

Дисертантом порівняно визначення потенційних цитотоксичних факторів стандартними методами та методом біоіндикації з використанням клітинної тест-системи *D. viridis*. і показано наявність зв'язку між даними методу біоіндикації та концентрації циркулюючих імунних комплексів, пептидів середньої молекулярної маси та ступенем лімфцитотоксичності.

У *третьому розділі* представлено результати досліджень: зміни фізіологічних параметрів та імунологічних показників вродженого імунітету у експериментальних тварин після світлового впливу різних довжин хвиль ($\lambda = 660$ нм, 530 нм, 470 нм,) на різні етапи запального процесу у експериментальних тварин; проведена оцінка зміни проліферативної активності в культурі лейкоцитів периферичної крові пацієнтів з хронічним запаленням після введення екзосом в культуральну систему; за допомогою біоіндикатора *D. viridis* визначали молекулярну масу і концентрацію наночастинок діоксиду церію, які є безпечними для практичного використання, так як не володіють цитотоксичністю.

Автором доведено, що комбінована світлова дія з використанням різних довжин хвиль (червоне світло $\lambda = 660$ нм, зелене світло $\lambda = 530$ нм, синє світло $\lambda = 470$ нм) та у поєднанні з додатковим біологічним фактором стимулює утворення АФК, регулюючи функціональний стан фагоцитів, що проявляється в активації хемотаксису та ендоцитозу нейтрофілів, посиленні стимуляції окислювального резерву ферментів у кисень-залежному фагоцитозі.

Автор також представив результати лікування пацієнтів з трофічними ранами гомілки, які пройшли комплексне лікування (фотодинамічна терапія, екзосоми та наночастинок, нанесені на штучне покриття ран) відповідно до їх «інформованої згоди».

У *четвертому розділі* представлено обговорення результатів. Таким чином, автор обґрунтовує застосування певних фізичних, біологічних і хімічних факторів, які можуть бути використані в медичній практиці на певних стадіях хронічних запальних процесів для скорочення строків лікування і ефективного загоєння ран.

Автором встановлено, що використання комплексної схеми світлової дії та екзосом МСК сприяє нормалізації загальних метаболічних порушень диференціювання професійних фагоцитів та показників гуморального імунітету (ступінь лімфцитотоксичності, концентрація циркулюючих імунних комплексів). Крім того, показано, що фотовплив різними довжинами хвиль при довготривалому запальному процесі сприяє повному очищенню гнійних ран, швидкому зменшенню ранової поверхні та позитивній динаміці.

Застосування екзосом у вигляді аплікацій на ранову поверхню посилює регенеративну функцію та процес епітелізації.

Дослідження в дисертаційній роботі виконані на достатній кількості експериментального матеріалу.

Висновки дисертаційної роботи підкреслюють наукову новизну проведених досліджень.

Найвагоміші наукові результати, представлені в дисертації: запропоновано алгоритм комбінованого методу застосування фізичних, біологічних та хімічних чинників для практичного використання під час корекції стадій запальної реакції, які сприяють поліпшенню мікроциркуляції, підвищенню біоенергетичного потенціалу та активності клітинних мембран при хронічному запальному процесі.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендації, сформульованих у дисертації. На основі тексту дисертації та змісту публікацій Биченко К.О. можна стверджувати, що результати, представлені в дисертації, обґрунтовані, достовірні та відповідають меті і завданням дисертаційної роботи. Обґрунтованість і достовірність представлених результатів забезпечується:

- застосуванням надійно перевірених теоретичних моделей та статистичних методів до найновіших спостережних даних;
- систематичним порівнянням отриманих результатів з сучасними дослідженнями інших авторів;
- публікацією результатів дисертаційного дослідження в наукових виданнях найвищого рівня;
- достатньою апробацією отриманих результатів на наукових конференціях.

Повнота викладу отриманих результатів у публікаціях. Результати роботи опубліковані в 23 наукових працях, з них 5 статей у фахових виданнях, 1 – у журналі, індексованому в наукометричній базі Scopus, 15 тез доповідей та 2 публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації.

Оформлення дисертації. Оформлення, зміст, структура дисертації та кількість публікацій відповідають вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. No 44) та

наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

Наукове, теоретичне та практичне значення результатів дисертації. Проведені дослідження дозволили: обґрунтувати деякі механізми після фотодії різними довжинами хвиль на етапи запалення; оцінити дію екзосом стовбурових клітин як активаторів проліферативного потенціалу в культурі клітин та з'ясувати ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками для розробки показань до їхнього спільного застосування. Виявили: різні ефекти після використання світлової дії різних довжин хвиль на стадії запалення; активацію проліферації клітин у культурі після застосування екзосом стовбурових клітин, які можуть бути використані як індуктор репарації при запаленні; оптимальні розміри та концентрацію наночастинок діоксиду церію, що не виявляють цитотоксичності та можуть використовуватися у вигляді цитопротекторів, антиоксидантів та активаторів мікроциркуляції при запальних процесах.

Висновки та пропозиції виробництву повністю витікають із наведених результатів, викладені стисло та обґрунтовано.

Проведені автором дослідження дозволили обґрунтувати одержані результати. Робота виконана на високому науково-методичному рівні, що дало можливість одержати об'єктивну інформацію та зробити практичні висновки і надати рекомендації виробництву.

Отримати об'єктивні результати і зробити теоретичні та практичні висновки і розробки дозволили сучасні лабораторні методи досліджень, які використовувалися автором.

Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.

Мета наукової роботи досягнута. Завдання виконані у повному обсязі. Принципових і суттєвих зауважень до роботи немає, всі розділи були оцінені позитивно.

К автору є наступні питання:

1. Яка цінність, при такому багатому клінічному матеріалі, де продемонстровано позитивний вплив на хронічні запальні процеси, ваших досліджень на тваринах?

2. З якою метою для комплексної корекції запального процесу в клініці застосовують наночастинок?

3. Наведіть принциповий механізми впливу екзосом?

4. В Ваших дослідженнях використовувалися інші клітинні мішені після фотопливу?

Загальний висновок

Вважаю, що дисертаційна робота **Биченко Катерини Олексіївни** «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» **є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам** «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 .р. № «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій». Вважаю, що **Биченко Катерина Олексіївна** заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» – за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент,
доктор сільськогосподарських наук,
член-кореспондент НААН України,
професор кафедри анатомії та
фізіології людини імені професора Я.Р. Синельникова
Харківського національного педагогічного
університету імені Г.С. Сковороди

ІГОР ІОНОВ

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 11:29:41 26.12.2023

Назва файлу з підписом: Відгук Іонов 21.12.2023.pdf.p7s
Розмір файлу з підписом: 688.1 КБ

Назва файлу без підпису: Відгук Іонов 21.12.2023.pdf
Розмір файлу без підпису: 670.0 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Іонов Ігор Анатолійович

П.І.Б.: Іонов Ігор Анатолійович

Країна: Україна

РНОКПП: 2112407911

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 17:31:09
25.12.2023

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF9704000000890BABB00EF559D01

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Серійний номер носія особистого ключа: Не визначено

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в одному файлі (CAAdES enveloped)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований

Голові разової
спеціалізованої вченої ради
Харківського національного
університету імені В.Н.
Каразіна
професору Бересту. В.П.

майдан Свободи 4, м. Харків, 61022

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, завідувачки кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка **Сибірної Наталії Олександрівни** на дисертаційну роботу **Биченко Катерини Олексіївни** на тему «**Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення**», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Ознайомившись із дисертаційною роботою Биченко Катерини Олексіївни вважаю, що відповідна праця є **сучасним науковим дослідженням в галузі біології**, що ставить за мету дослідження механізмів впливу фізичних та біологічних факторів на імунорезистентність в умовах індукції експериментального запалення та оцінку ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних розмірів та різної концентрації в якості хімічного фактора для комплексного застосування при запальній реакції.

Актуальність теми дослідження.

Запалення відоме людству ще з часів Гіпократата, який ототожнював “запалення” та “захворювання”. Дискусія з цього приводу продовжується протягом віків, але і до наших днів ще точно не встановлене його місце в біології, медицині та патології. На сьогодні вважають, що запалення – це унікальна категорія загальної патології. Цей важливий та складний процес є результатом еволюції і був сформований як механізм захисту організму. Головне завдання запалення - локалізація патологічного вогнища, елімінація патогенного агента і відновлення нормальної функції клітин, тканини, органу. Розвиток процесу запалення тісно пов’язаний із функціонуванням як клітинної, так і гуморальної ланки імунітету. Існує проблема корекції імунометаболічних показників при хронічних запальних

реакціях. Фундаментальний та практичний інтерес має з'ясування того, як екзогенні фактори (фізичні, хімічні, біологічні) впливають на запальний процес. Для вирішення цієї проблеми використовують багато різних підходів, існує практика використання різних факторів – фізичних, біологічних та хімічних, які впливають на перебіг запального процесу. В якості фізичних факторів застосовують фотоопромінення різними довжинами хвиль видимого діапазону спектра, але констатація позитивного ефекту таких впливів залишає нез'ясованим питання щодо механізмів та рівня ефективності такого способу корекції при локальних та системних запальних процесах. Для корекції імунометаболічних порушень також застосовують стовбурові клітини та їхні метаболіти. Крім світлового впливу та стовбурових клітин також застосовують різні наночастинки для підтримки редокс-системи клітин і мікроциркуляції. Наночастинки різного походження можуть виконувати транспортну функцію, володіють здатністю проникати крізь біомембрани та змінювати функції біомолекул. В цьому аспекті діоксид церію володіє цілим рядом позитивних впливів на метаболізм організму. Однак, через суперечливі відомості про цитотоксичність наночастинок, їхнє застосування супроводжується постійною дискусією про можливі механізми їхньої дії на динаміку локальних та системних запальних процесів та біологічну безпеку, а також не визначено допустимі дози та оптимальні розміри, які б не мали високого ступеня цитотоксичності.

Таким чином, вибрана тема дисертаційної роботи, метою якої було вивчення механізмів біологічних ефектів та дії різних довжин хвиль фотоопромінювання на стадії запального процесу, екзосом мезенхімальних стовбурових клітин на стимуляцію проліферативного потенціалу імунокомпетентних клітин в культурі *in vitro* та визначення ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних характеристик є вкрай актуальною.

Загальна характеристика дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків та списку цитованої літератури. Дисертацію викладено на 178 сторінках машинного тексту, вона містить 45 рисунків та 6 таблиць, цитується 215 літературних джерел.

У вступі наведено обґрунтування вибору теми дослідження, означено мету та поставлено завдання для її досягнення, об'єкт, предмет та методи дослідження, розкрито наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, вказано особистий внесок здобувача при виконанні

дослідження, наведено перелік наукових публікацій за темою дослідження та дані щодо апробації матеріалів дисертації, вказано зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Розділ 1 - Огляд літератури, складається з чотирьох підрозділів, присвячених розгляду метаболічних та імунологічних змін при розвитку запального процесу, біологічних ефектів світлового впливу, біологічних властивостей екзосом стовбурових клітин та біологічної активності наночастинок діоксиду церію

Розділ 2 - Матеріали і методи дослідження, присвячений опису методів, використаних при виконанні роботи. Після ознайомлення з цим розділом слід відзначити належний методичний рівень роботи. У роботі були використані різноманітні та адекватні відносно поставлених завдань сучасні та класичні методи досліджень: фізіологічний (визначення динаміки маси тіла та температури, оцінка рухової активності та апетиту); світлова мікроскопія (визначення активності нейтрофілів периферичної крові в кисень-незалежному та кисень-залежному фагоцитозі, ступеня лімфоцитотоксичності, проліферативної активності лімфоцитів в культурі *in vitro*, цитотоксичності з використанням біоіндикатора *D. viridis*); спектрофотометрія (визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові); статистичні методи оцінки результатів.

У Розділі 3 - Результати досліджень, викладено основні наукові результати. Розділ добре структурований, виклад даних логічний, допомагає прослідкувати логіку запланованих експериментальних досліджень. Інтерпретація фактів, отриманих дослідником, є важливим елементом роботи. У даній дисертації їй присвячено розділ 4 - Обговорення результатів, в якому подається кваліфіковане та аргументоване обговорення основних підсумків роботи, які підтверджуються результатами власних досліджень та результатами літературних даних.

Висновки містять узагальнюючий висновок, 6 висновків по окремих розділах експериментальних досліджень, та прикінцевий узагальнюючий висновок.

Зв'язок дисертаційної роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна «Розробка біосумісних імплантатів кісткової тканини і шкіри та використання електромагнітного випромінювання оптичного діапазону спектра для оптимізації процесів регенерації» (№ держреєстрації 0116U000816), «Розробка мобільних фототерапевтичних апаратів для профілактики та лікування синдрому діабетичної стопи» (№ держреєстрації 0118U0002029) та ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В.Т. Зайцева НАМН України «Вивчити молекулярні механізми перебігу ранового процесу з огляду на процеси п'єзобіосинтезу та розробити нові методи лікування ран з використанням комбінованих покривних матеріалів» (№ держреєстрації 0118U000015).

Наукова новизна отриманих результатів.

Не викликає сумніву **наукова новизна** роботи та її важливе **теоретичне та практичне значення**.

До найвагоміших результатів, що містяться в дисертації, слід віднести наступні:

- У роботі виявлено позитивну динаміку змін показників фагоцитозу та гуморальних факторів імунітету після впливів фізичних, біологічних та хімічних факторів. Як фізичні методи використовували фотовплив різного діапазону видимого спектру ($\lambda = 660 \text{ нм}, 530 \text{ нм}, 470 \text{ нм}$);
- Вперше встановлено, що вплив червоного світла ($\lambda = 660 \text{ нм}$) посилює функції хемотаксису та адгезії нейтрофілів у кисеньнезалежному фагоцитозі, збільшується їхня бактеріальна активність, пов'язана з утворенням активних форм кисню (АФК), активуються гуморальні реакції, що призводить до скорочення першої стадії запалення на 9 діб. Вплив зеленого світла ($\lambda = 530 \text{ нм}$) посилює поглинальну здатність фагоцитів, що призводить до ефективної елімінації циркулюючих імунних комплексів і сприяє регенеративним процесам та скороченню другої стадії запального процесу на 6 діб. На стадії проліферації найбільший позитивний ефект має синє світло ($\lambda = 470 \text{ нм}$), яке інгібує зайву фагоцитарну активність та нормалізує рівень гуморальних факторів (ступінь лімфоцитотоксичності та концентрація циркулюючих імунних комплексів), сприяє скороченню закінчення запалення на 5 діб;
- Виявлено позитивний ефект низькоінтенсивного світлового впливу різних довжин хвиль, екзосом з метаболітами прогенераторних стовбурових клітин та аплікацій наночастинок діоксиду церію на

- різних стадіях запального процесу, про що свідчили зміни імунофізіологічних показників;
- Запропоновано алгоритм комбінованого методу застосування фізичних, біологічних та хімічних чинників для практичного використання під час корекції стадій запальної реакції, які сприяють поліпшенню мікроциркуляції, підвищенню біоенергетичного потенціалу та активності клітинних мембран при хронічному запальному процесі.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, сформульованих у дисертації.

Обґрунтованість та достовірність наукових результатів, отриманих Биченко К.О., забезпечуються використанням фундаментальних біологічних підходів і методів, аналізу сучасних наукових поглядів на досліджувану проблему та порівняння отриманих результатів із результатами інших дослідників, опублікованих в відомих міжнародних виданнях. Основні результати дисертаційного дослідження опубліковані в фахових наукових журналах та доповідалися на міжнародних конференціях. Висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими.

Апробація та публікації.

Основні положення і результати роботи доповідалися на науково-практичних конференціях:

Photodiagnosis and photodynamic therapy. Application of lasers in medicine and biology (24-29 August 2012, Helsinki, Finland,);

XLIV Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (26-28 травня 2016, Харків);

XLVI Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (25–27 травня 2017, Харків);

XLVII Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (12-14 жовтня 2017, Київ);

науково-практична конференція з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (9-10 листопада 2017, Київ);

XVIII International Scientific and Practical Conference «Modern Science, Practice» (2 –6 May 2020, Boston, USA);

XLVIII Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (24-25 травня 2018, Харків);

XLIX international scientific and practical conference «Application of lasers in medicine and biology and 2nd Gamaleia's readings» (3-7 october 2018, Hajduszoboszlo, Hungary);

IEEE 8th International Conference on Advanced Optoelectronic and lasers,

CAOL-2019 (06–08 September 2019, Sozopol, Bulgaria);

XX International Scientific and practical conference «Perspective directions for the development of science and practice» (08-09 June 2020, Athens, Greece);

XII International scientific and practical conference «Scientific achievements of modern society» (22–24 June 2020, Liverpool, United Kingdom);

V International scientific and practical conference «World Science Problems, Prospects and innovation» (27-29 January 2021, Toronto);

V Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині» (23 квітня 2021, Харків);

I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (25 березня 2021, Харків).

Публікації.

За матеріалами дисертаційної роботи було опубліковано 23 наукових праці, з них 5 статей у фахових виданнях, 1 – у журналі, індексованому в наукометричній базі Scopus, 15 тез доповідей та 2 публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації.

Оформлення дисертації.

Оформлення дисертації повністю відповідає вимогам, що висуваються до такого виду робіт і наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації». Текст дисертації написаний українською мовою в науковому стилі з чіткою подачею графічного матеріалу.

Практичне значення результатів дисертації.

Проведені дослідження дозволили: обґрунтувати деякі механізми після фотоопромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення; оцінити дію екзосом стовбурових клітин як активаторів проліферативного потенціалу в культурі клітин та з'ясувати ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками для розробки показань до їхнього спільного застосування.

Результати дисертаційної роботи дозволили визначити особливості вибіркової дії різних довжин хвиль на модифікацію біомолекул на різних стадіях запального процесу. Дослідження змін механізмів імунорезистентності після дії різних довжин хвиль видимого діапазону на етапи запального процесу сприяє розробці показань до їхнього застосування. Виявлена активація проліферації клітин у культурі після впливу екзосом стовбурових клітин може бути використана як індуктор репарації при запаленні. Наночастинки діоксиду церію малих розмірів у низькій концентрації, які не проявляють цитотоксичності, можуть використовуватися у вигляді цитопротекторів,

антиоксидантів та активаторів мікроциркуляції на стадії альтерації запального процесу.

Відомості про дотримання академічної доброчесності.

У дисертаційній роботі Биченко Катерини Олексіївни «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фальсифікації та інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертаційного дослідження.

Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.

Мета наукової роботи досягнута. Завдання виконані у повному обсязі. Принципових і суттєвих зауважень до роботи немає, всі розділи були оцінені позитивно.

У межах наукової дискусії хотілось б поставити наступні запитання:

1. В якості джерела екзосом використовували культуру мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) плаценти. В роботі сказано: « Використання даного способу дозволило **отримати і концентрувати мікроРНК**, що містять екзосоми МСК для стимуляції регенеративних процесів в короткі терміни.» Ніде в подальшому в роботі про мікроРНК не йдеться. Чому? Це дуже цікаво оцінити, які саме гени були таргетними для даної мікроРНК? Чи є дані про нуклеотидну послідовність цієї мікроРНК? Чи вона там представлена в одному варіанті?
2. Щодо чіткості викладу наукових даних без лабораторного сленгу, потрібно звернути увагу на назву підрозділу **2.8 Визначення ступеня лімфоцитотоксичності**. Термін «лімфоцитотоксичність» має кілька трактувань, тому у даному випадку потрібно було вказати, що мова йде про «лімфоцитотоксичність аутосіроватки», яка діяла на лімфоцити у присутності білків комплементу, а не цитотоксичність самих лімфоцитів. Проводили дослідження з використанням класичного методу Терасакі, тобто тест на лімфоцитотоксичність аутосіроватки, яка містила відповідні антитіла.
3. Хочу звернути увагу автора на прецизійність наведення статистичної обробки даних. Так як для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента, то слід оперувати наступними величинами: наприклад,

достовірною вважається різниця при показах вірогідності $p \geq 0,95$, а рівень значимості при цьому $P < 0,05$, які знаходяться після обчислення t за таблицею t -розподілу Стюдента. В дисертації скрізь наведено $p < 0,05$ (маленька буква p , а це - помилка).

5. Висновки носять констатуючий характер і не наводять жодного механізму формування того, чи іншого біологічного ефекту, який фіксувався в експериментах.

6. Жаль, що в дисертації не представлена узагальнююча схема дії досліджуваних чинників. Вона, без сумніву, була б дуже корисною для інтерпретації отриманих результатів, де можна було б вказати гіпотетичні і експериментально підтверджені точки впливу застосованих речовин і уявити собі біохімічні механізми їхньої дії.

7. У роботі часто зустрічаються стилістичні помилки, а також невдалі у мовному та науковому сенсі вирази.

8. З якою метою у власних результатах дисертанка наводить Рис. 3.42 – фото заживлення виразки на нозі у людини?

Однак, всі зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку. Проблема, яку досліджує автор дисертації, надзвичайно важлива, а одержані нею дані вносять вагомий вклад у з'ясування біологічних ефектів фотоопроміювання різних довжин хвиль (червоне $\lambda = 660$ нм, зелене $\lambda = 530$ нм, синє $\lambda = 470$ нм) на стадії запального процесу, та дії біологічних (екзосоми мезенхімальних стовбурових клітин) та хімічних (наночастинки діоксиду церію) факторів, які можуть бути використані у поєднанні зі світловим впливом для скорочення окремих стадій запальної реакції.

Загальні висновки.

Дисертаційна робота **Биченко Катерини Олексіївни** «Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопроміювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення» є **завершеним науковим дослідженням, є актуальною та має наукову новизну і практичну значущість**. Тема і зміст дисертації відповідають галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія», вимогам згідно наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44). Враховуючи актуальність, обґрунтованість наукових положень і висновків, наукову новизну та практичну значущість дисертаційної роботи, а також дотримання

академічної доброчесності, що підтверджено відповідними документами, вважаю, що **Биченко Катерина Олексіївна** заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

Доктор біологічних наук, професор,
завідувачка кафедри біохімії

Львівського національного університету

Імені Івана Франка

Наталія СИБІРНА

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 14:49:32 27.12.2023

Назва файлу з підписом: Харків_Відгук_Сибірна.pdf
Розмір файлу з підписом: 256.9 КБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Харків_Відгук_Сибірна.pdf
Розмір файлу без підпису: 232.6 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: СИБІРНА НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА
П.І.Б.: СИБІРНА НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА
Країна: Україна
РНОКПП: 2069620904
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 14:49:32 27.12.2023
Сертифікат виданий: АЦСК АТ КБ «ПРИВАТБАНК»
Серійний номер: 248197DDFAB977E504000000427D1B0119286104
Алгоритм підпису: ДСТУ-4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підпис PDF-файла (PAdES)
Формат підпису: З позначкою часу від ЕП (PAdES-B-T)
Сертифікат: Кваліфікований