

ВІДГУК
офіційного опонента про дисертацію
Лихацького Петра Григоровича
«ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ У ЩУРІВ ЗА ДІЇ НАТРІУ НІТРИТУ
ТА ТЮТЮНОВОГО ДИМУ, ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ ВИЯВЛЕНИХ ПОРУШЕНЬ»
представлену на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 - біохімія

Однією з загроз здоров'ю людини є широка розповсюдженість тютюнопаління. В Україні тютюнопаління є суттєвою медичною та соціально-економічною проблемою внаслідок значного розповсюдження серед усіх вікових груп населення. Тютюновий дим містить компоненти, які володіють токсичною, мутагенною та канцерогенною дією на організм. Добре відома значна кількість онкохворих (рак гортані, легень) у групах активних курців. Сполуки, що містяться в тютюновому димі чинять негативний вплив на стінку судин, викликаючи ендотеліальну дисфункцію, наслідком чого є гіпертензія і посилене утворення атеросклеротичних бляшок. Суттєву небезпеку тютюнопаління становить до так званих пасивних курців, що вдихають цигарковий дим. Особливо небезпечне пасивне куріння для молодих статевонезрілих особин з інтенсивним метаболізмом, які можуть не тільки відчувати погане самопочуття за контакта з курцями, але й набувати часто незворотних біохімічних змін у тканинах та органах. Ці зміни підвищують ризик в подальшому передчасної смерті від серцево-судинних, респіраторних, онкологічних захворювань тощо.

В тютюновому диму міститься у значних кількостях нікотин, смолисті речовини, оксид карбону, оксиди нітрогену, важкі метали тощо. Ці речовини викликають загальне отруєння організму, посилення окисних процесів в тканинах, мітохондрійну дисфункцію, запалення. За кінцевим рахунком, зазначені процеси призводять до метаболічних та морфо-функціональних порушень на тканинному рівні.

В аграрно-промислових районах України поряд із значним поширенням тютюнопаління, а отже і явищем пасивного паління молоддю, суттєвою загрозою є також потрапляння в організм нітритів/нітратів. Останні викликають в тканинах гіперпродукцію нітрогену оксидів, що зумовлює гіпоксичний та вільнорадикальний некробіоз. Натомість в науковій літературі явно недостатні відомості щодо вільнорадикальних, біоенергетичних та запальних процесів в організмі тварин за одночасної нітритно-тютюнової інтоксикації, що складає загальнобологічну проблему. Особливо важливим є дослідження зазначених явищ у віковому аспекті з метою порівняння інтенсивності біохімічних процесів розвитку патологічних станів у молодих, статевозрілих та старих особин. Необхідним є також пошук речовин, які б чинили позитивний фармакологічний вплив за умови комбінованої інтоксикації. Серед них перспективними здаються цитопротектор, антиоксидант та антигіпоксант мілдронат, а також ентеросорбент карболайн.

Отже, мета дисертаційної роботи **Лихацького Петра Григоровича**, а саме з'ясувати особливості метаболізму в динаміці ураження щурів різного віку натрію нітритом на тлі тютюнової інтоксикації, а також оцінити ефективність застосування за даних умов препарату метаболічної дії мілдронату та ентеросорбенту карболайну, є вельми актуальною.

Структура рукопису відповідає класичній схемі. Він включає інформацію щодо сучасного стану проблеми та ряду нез'ясованих питань, опис методичних підходів автора, наведено результати власних досліджень із відповідним обговоренням. Текст дисертаційної роботи закінчується висновками та списком використаної літератури, а також додатками.

Розділ «Огляд літератури» містить достатньо повний аналіз сучасних даних з таких проблем, як: метаболізм та біохімічні механізми впливу на організм нітросполук; хімічний склад тютюнового диму та закономірності його пошкоджуючого впливу на тканини та органи, аспекти мутагенної дії; особливості використання та можливі механізми впливу на клітини мельдонію (мілдронату); характеристика карбон-вмісних сорбентів, передусім

карболайну, та відомі шляхи їхньої дії як ентеросорбентів. В кінці автор розміщує підсумовуючий абзац, що лаконічно окреслює проблему, яка буде експериментально вирішуватися в дисертаційній роботі.

В розділі «Матеріали та методи дослідження» дано вичерпний опис сучасних адекватних поставленим задачам методів, які було використано дисертантом, зокрема біохімічних, імуноферментних, гематологічних, гістологічних та інших. Наведено загальну схему досліджень, яка спрощує подальше сприйняття експериментального матеріалу.

В рубриці «Результати досліджень» (розділи 3-5, експериментальне дослідження, а також розділ 6 – «Аналіз та обговорення результатів власних досліджень») автором викладено основні експериментальні результати з їхнім ґрунтовним аналізом. В процесі проведення експерименту Лихацьким П.Г. вивчено зміни вмісту активних форм кисню за умови поєднаної дії токсикантів. Зокрема, спостерігалось виражене зростання активних форм в гранулоцитах крові статевонезрілих щурів. Після одночасного ураження тварин тютюновим димом та натрію нітритом у сироватці крові усіх вікових груп суттєво інтенсифікувались процеси перекисного окиснення ліпідів. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові був значно вищий, ніж за умови дії токсикантів окремо. Активація процесів ліпопероксидації спостерігалась у нирках щурів різного віку. Найбільш чутливими до дії обох токсикантів виявились легені та міокард статевонезрілих тварин. Після ураження натрію нітритом на тлі інтоксикації тютюновим димом зареєстрована окисна модифікація протеїнів у сироватці крові щурів усіх вікових груп. Найбільш чутливими до дії токсикантів виявились нирки піддослідних тварин. Натрію нітрит спричинював гемічну гіпоксію, що відображає зростання вмісту метгемоглобіну, особливо у статевонезрілих особин. Ураження тютюновим димом поглиблює гіпоксію, про що свідчить зростання вмісту карбоксигемоглобіну. Найбільший вміст модифікованого гемоглобіну виявився у статевонезрілих щурів. Спільний вплив натрію нітриту та тютюнового диму суттєво пригнічує антиоксидантні системи організму, що

зумовлює поглиблення оксидативного стресу. Зокрема, відмічено зниження активності супероксиддисмутази у сироватці крові та печінці щурів, каталази у всіх досліджуваних органах та рівня відновленого глутатіону у сироватці крові. Одночасно зростає вміст церулоплазміну. Зазначені зміни були особливо виражені в тканинах статевонезрілих тварин. Перекисне окиснення ліпідів та окисна модифікація протеїнів призводять до зростання проникності мембран. Дисертантом зареєстроване зростання проникності мембран еритроцитів, яке було найбільш виражене у статевонезрілих щурів протягом експерименту. Після ураження нітритом натрію на тлі дії тютюнового диму у піддослідних тварин спостерігався цитоліз в досліджених тканинах. Це супроводжувалось реципрокними змінами маркерів цитолізу. У сироватці крові статевонезрілих щурів зростала активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, лактатдегідрогенази, гама-глутамілтранспептидази, лужної фосфатази. В органах щурів різного віку спостерігалось відповідне зниження активності зазначених ензимів, що може свідчити про зростання неспецифічної проникності клітинних мембран. Продемонстровано, що стан окисного стресу на тлі змішаної гіпоксії, що мають місце за умови комплексної інтоксикації, призводять до зниження процесів енергозабезпечення. Суттєво гальмувалась активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази мітохондрій досліджуваних тканин, причому найбільш виражене інгібування спостерігалось саме в організмі статевонезрілих та старечих щурів. Поєднана дія токсикантів мала наслідком зростання вмісту молекул середньої маси в організмі піддослідних тварин – вторинних ендогенних токсинів, а найвищим цей показник виявився в кінці експерименту у статевонезрілих щурів. Окисний стрес на фоні нагромадження в організмі токсинів призвів до розвитку запальної реакції. Зокрема, спостерігався дисбаланс вмісту про- та антизапальних цитокінів (зростала кількість прозапального ІЛ-6 та знижувалась протизапального ІЛ-4), а також у сироватці крові збільшувався рівень С-реактивного протеїну – маркеру гострої фази запалення. Одночасне ураження тварин натрію нітритом

та тютюновим димом призводило до суттєвого зростання вмісту нітрит-аніонів в тканинах щурів. Цей факт можна пояснити як посиленням потраплянням до організму окислів азоту в експериментальних моделях, так і специфічними змінами у активності NO-синтаз. Так, в тканинах уражених щурів спостерігалось суттєве зростання активності індукційної NO-синтази поряд зі зменшенням активності конститутивної ізоформи (ендотеліальної). Ці дані свідчать на користь розвитку нітрооксидного стресу на тлі нітритно-тютюнової інтоксикації. Проведені за цих умов гістохімічні дослідження зрізів тканин щурів показали структурну реорганізацію легень, печінки, нирок, серця у всіх вікових групах, особливо інтенсивні зміни спостерігались в легенях старих та статевонезрілих тварин. Одержані результати свідчать про суттєву морфо-функціональну деструкцію досліджуваних тканин, яка відображається у відповідних змінах біохімічних показників. Експериментальна частина роботи підсумовується авторською схемою розвитку нітритно-тютюнового стресу. **Таким чином, Лихацьким П.Г. вперше проведені комплексні дослідження зміни метаболізму у щурів за умови комбінованого нітритно-тютюнового отруєння, що є важливим із фундаментальної точки зору.**

З метою корекції метаболічних порушень у щурів, спричинених дією натрію нітриту на тлі тютюнової інтоксикації, було використано мілдронат – сполуку, що володіє антигіпоксантиною, антиоксидантною дією і справляє загальний коригуючий вплив на клітинні процеси. Лихацький П.Г. продемонстрував суттєву антиоксидантну та антигіпоксантину активності мілдронату саме за умови комбінованого ураження тварин. Зокрема, було продемонстровано активацію систем антиоксидантного захисту, зниження інтенсивності нітрооксидного стресу, сповільнення вільнорадикальних реакцій, посилення енергетичного обміну, гальмування цитолізу та процесів запалення. Поряд з цим, ентеросорбент карболайн діяв у напрямку зниження ендогенної інтоксикації та призвів до сповільнення вільнорадикальних та запальних процесів в організмі уражених щурів. Ці результати дозволяють

рекомендувати мілдронат та карболайн для використання в клініці гострих отруєнь. **Отже, практичне значення представленої на захист дисертаційної роботи не викликає сумнівів.**

Наведені в кінці роботи висновки впливають із завдань і є правомірними. Наведена коректна статистична обробка експериментальних даних. Рисунки демонстративні. Використано достатньо сучасні методи досліджень, які відповідають меті та завданням роботи. Експериментальні результати, що викладено в дисертації, опубліковані у відкритому друці у вигляді **37 публікацій**, серед них **25** — у фахових виданнях, затверджених Департаментом атестації кадрів вищої кваліфікації Міністерства освіти і науки України, **1** – інформаційний лист, **1** — патент України на корисні моделі. Матеріали дисертаційної роботи доповідались на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях та з'їздах (**10 тез доповідей**). Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України. Результати досліджень ілюстровано 84 рисунками та 68 таблицями. Список літератури містить значну кількість сучасних посилань. Автореферат дисертації відображає основний зміст проведених досліджень.

До безумовних переваг дисертаційної роботи слід віднести:

- комплексний підхід до вирішення проблеми: аналіз змін значної кількості біохімічних параметрів у щурів різного віку, у різних метаболічно-активних тканинах за дії токсикантів окремо та їхньої сукупної дії;
- використання широкого спектру надійних біохімічних методів як традиційних, так і сучасних, що робить роботу високою мірою наукоємною;
- якісно здійснені гістохімічні дослідження;
- застосування великої кількості експериментальних тварин і проведення відповідних серій незалежних експериментів, що, разом із залученням адекватних методів статистичного аналізу одержаних результатів, робить їх достатньо надійними;
- висока практична значущість проведеної роботи.

Автором опубліковано інформаційний лист «Вікові аспекти біохімічної оцінки ступеня інтоксикації за умов нітритного отруєння». Новизна дослідження підтверджена патентом України на корисну модель.

Під час аналізу роботи виникли зауваження та запитання.

Зауваження.

1. Результати по визначенню маркерних ензимів в тканинах та сироватці крові бажано було б подати в авторефераті у вигляді таблиці.
2. Активність ензимів бажано виражати на мг протеїну за хвилину.
3. В тексті дисертації та авторефераті не завжди акцентується увага на кількісній різниці між ефектами обох токсикантів окремо та їх комбінації.
4. Мають місце поодинокі невдалі вирази і описки.
5. «Додатки» доцільно було б інкорпорувати до основного тексту дисертації.

Запитання.

1. Церулоплазмін володіє антиоксидантними властивостями. Його кількість в тканинах зростає внаслідок окисного стресу як захисна реакція організму. Чи є позитивним зниження вмісту церулоплазміну за дії мілдронату?
2. АЛТ є маркерним ензимом печінки, АСТ – міокарда. Чи доречно визначати всю сукупність ензиматичних активностей (АСТ, АЛТ, ЛДГ, лужну фосфатазу тощо) в усіх досліджуваних тканинах?
3. Відомо, що NO за гіперпродукції незворотно пригнічує цитохромоксидазу. Чи розглядаєте Ви зазначений ефект як можливе пояснення інгібування цього ензиму?
4. За умови гіпоксії посилюється нітрит-редуктазна активність гем-вмісних протеїнів, зокрема мітохондрій та ендоплазматичного ретикулула. Чи не є це важливою причиною зростання вмісту оксиду азоту в організмі щурів за їх ураження?

Побажання.

Бажано було б провести серію досліджень по одночасному застосуванню мілдронату з карболайном. Можливо, що спостерігався б більш виражений нормалізуючий ефект.

Наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність проведеного дослідження. Характеризуючи роботу в цілому можна стверджувати, що вона відповідає профілю 03.00.04 - біохімія. За актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичною і практичною цінністю, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску автора і зроблених висновків дисертація є окремим завершеним дослідженням, яке вирішує наукову проблему, і відповідає вимогам пунктів 10 та 13 «Порядку присудження наукових ступенів» КМУ від 24 липня 2013 р. № 567. Вважаю, що Лихацький Петро Григорович заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  Данилович Ю.В.

19.11.18 р.

