

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Лихацького Петра Григоровича
«Вікові особливості метаболізму у щурів за дії натрію нітриту та
тютюнового диму, шляхи корекції виявлених порушень»
представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за фахом 03.00.04 – біохімія

09 Біологія

Дисертаційне дослідження П.Г. Лихацького присвячене експериментальному обґрунтуванню нових підходів корекції тютюнової інтоксикації на підставі вивчення вікових особливостей прооксидантно-антиоксидантної системи, нітрооксидативного стресу, біоенергетичних процесів, маркерів ендогенної інтоксикації.

Актуальність теми

На сьогодні не викликає сумніву, що широка розповсюдженість тютюнопаління – глобальна проблема людства. Небезпека тютюнопаління виявляється не лише негативним впливом на стан здоров'я курців, але й на стан осіб, які не палять. Активне та пасивне куріння тютюну викликає утворення активних форм кисню (перекис гідрогену, епоксиди, нітрогену оксид (NO та ін.), які активують процеси вільнорадикального окиснення в організмі, зокрема перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Існує все більше доказів того, що компоненти сигаретного диму погіршують мітохондріальну функцію та викликають мітохондріальний окислювальний стрес різних типів клітин. Вивчення показників окисно-антиоксидантного статусу в пасивних курців виявило подібність їх змін до таких у активних курців. Крім того, вплив сигаретного диму може активувати циркулюючі імуніцити в легенях, які вивільняють прозапальні цитокіни, що призводить до токсичних уражень організму. Слід зазначити, що у наявній науковій літературі дуже мало робіт, у яких би досліджувався вплив тютюнового диму на організм у віковому аспекті,

зокрема на вільнорадикальні та запальні процеси, проникність клітинних мембран та ступінь ендогенної інтоксикації, а також на функціонування NO-системи після ураження.

Стурбованість викликає також виникнення раніше невідомих хронічних захворювань і патологічних станів пов'язане із забрудненням навколишнього середовища. Частіш за все індукована екологією патологія розвивається під впливом хімічних забруднювачів, серед яких неорганічні нітросполуки. Надходження в організм нітритів зумовлює утворення надмірної кількості нітроген оксиду, який здатний ініціювати ланцюгові вільнорадикальні реакції. При цьому створюються передумови для утворення інших активних форм нітрогену, що може викликати гіпоксичний та вільнорадикальний некробіоз. Комбінація впливу нітритів та тютюнопаління дають початок формуванню поєднаних патологічних станів та виникнення поліорганної патології.

Саме тому дисертацію Лихацького П.Г., яка присвячена віковим особливостям метаболізму за дії натрію нітриту та тютюнового диму та пошукам шляхів корекції виявлених порушень, слід вважати доцільною та актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом комплексної планової наукової теми кафедр медичної біохімії та фармакології «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних та біогенних токсикантів в біологічних системах» (№ держ. реєстрації 0112U000542) та міжкафедральної планової наукової теми ДВНЗ «Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу» (№ держ. реєстрації 0116U003353), в якій автор досліджував активність окиснювального та нітроокиснювального стресів, зміни

функціональної активності антиоксидантної системи захисту, стан мембранних структур клітин різних органів, порушення енергетичного обміну та запальних процесів, ступінь ендогенної інтоксикації за умов одночасного впливу натрію нітриту та тютюнового диму, а також вивчав ефективність використання за цих умов препаратів мілдронат та карболайн.

Наукова новизна дослідження

Здобувачем, по суті, вперше проведені системні порівняльні дослідження перебігу вільнорадикальних процесів, зокрема, ліпопероксидації, окиснювальної модифікації протеїнів та метгемоглобіноутворення, а також функціонування NO-системи за умов одночасного ураження щурів натрію нітритом та тютюновим димом. Так, виявлено зростання у 3,2 рази продуктів ліпідної пероксидації, у 1,6 рази вмісту 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального характеру. У сироватці крові щурів усіх вікових груп підвищується активність індукцибельної NO-синтази та знижується активність ендотеліальної NO-синтази. Найбільш виражені зміни активності ензимів у статевонезрілих та старих щурів.

Також вперше виявлено, що за умов змодельованого патологічного стану показник еритроцитарного індексу інтоксикації у статевонезрілих тварин на 25,6 % перевищує такий у групі щурів, уражених лише тютюновим димом. Відмічено пригнічення активності біоенергетичних процесів в умовах нітритно-тютюнового інтоксикації, яке найбільш виражено у кінці експерименту у статевонезрілих щурів, і може бути підтвердженням розвитку гіпоксичного стану після ураження.

Вперше досліджено маркери цитолізу в умовах одночасного впливу на організм натрію нітриту та тютюнового диму. Вивчено показники запальних процесів в організмі тварин під впливом двох токсичних чинників шляхом дослідження вмісту про- та протизапальних цитокінів, а також маркера запалення – С-реактивного протеїну.

Автор експериментально обґрунтовує можливість корекції порушень при дії на організм натрію нітриту на тлі тютюнової інтоксикації. Використання мілдронату та ентеросорбенту карболайн призвело до активації системи антиоксидантного захисту, нормалізації процесів вільнорадикального окиснення та енергетичного обміну, сповільнення процесів цитолізу та запалення.

Вперше отримані дані, на основі яких можна стверджувати, що найбільш чутливими до одночасної дії обох токсикантів виявились статевонезрілі щури. Новизна дослідження підтверджена патентом України на корисну модель.

Практична цінність дослідження

Дисертантом проведено комплексне систематизоване експериментальне дослідження, суть якого полягає в детально вивчених молекулярних механізмах порушень метаболізму в умовах нітритно-тютюнового ураження щурів. Встановлено особливості функціонування NO-системи, співвідношення про- та антиоксидантних показників, цитокінового дисбалансу, біоенергетичних та запальних процесів, а також глибину проявів ендогенної інтоксикації та цитолізу в умовах даного патологічного стану.

Досліджувані показники можуть бути рекомендовані в клініко-лабораторну практику з метою визначення ступеня ураження організму екзогенними токсикантами. Експериментально обґрунтована та доведена ефективність препарату метаболічної дії (з антигіпоксантичними властивостями) мілдронату для корекції патологічного стану.

Практичне значення результатів даного дослідження підтверджується інформаційним листом «Вікові аспекти біохімічної оцінки ступеня інтоксикації за умов нітритного отруєння» (№128-2015 від 23.12.2015 р.). Результати дисертаційної роботи впроваджені у науково-педагогічний процес кафедр медичної біохімії ДВНЗ «Івано-Франківського

національного медичного університету», ДВНЗ «Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», ВДНЗ України «Буковинського державного медичного університету», Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, кафедри біохімії Національного фармацевтичного університету, кафедри біохімії Дніпропетровського національного університету імені О. Гончара, кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та кафедри лабораторної діагностики Миколаївського національного університету імені В.О. Сухомлинського.

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

Як здобувач наукового ступеня доктора біологічних наук, Петро Григорович Лихацький в своїй роботі спирається на чіткі критерії щодо відтворення окремих патологічних моделей та використання надійних методичних підходів визначення вікових особливостей метаболізму щурів за дії натрію нітриту та тютюнового диму. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів біохімічних, молекулярних, гематологічних та гістологічних досліджень, що базуються на адекватних методах та достатній статистичній і математичній обробці отриманого цифрового матеріалу. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає цілям та задачам досліджень, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

Загальні відомості про роботу

Дисертація викладена українською мовою на 488 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 5 розділів власних досліджень, розділу, присвяченого аналізу і узагальненню отриманих результатів, висновків,

списку використаних літературних джерел та додатків. Основний текст дисертації викладений на 359 сторінках. Робота ілюстрована 84 рисунками і 68 таблицями. Список використаних літературних джерел включає 521 найменування, з них 333 латиницею.

Характеристика змісту роботи

Вступ до роботи написано лаконічно із залученням основних посилань на узагальнюючі літературні джерела. Він є достатнім як з позиції актуальності обраної теми, так і сформульованої мети та завдань дослідження. У вступі охарактеризовано наукову новизну дослідження та її науково-практичну цінність. Наведено дані щодо публікацій та апробації основних, базових результатів дослідження.

Перший розділ роботи *«Огляд літератури»* вміщує основні положення, що стосуються аналізу особливостей сучасних уявлень про механізми дії, метаболізм та вплив на організм людини та тварин нітритів та нітратів. Автором прискіпливо аналізуються загальні властивості компонентів тютюнового диму та порушення в організмі, які вони викликають. Розглянуті патогенетичні механізми використання антиоксидантів, антигіпоксантів та ентеросорбентів за отруєнь різного генезу.

Другий розділ *«Матеріали та методи дослідження»* детально розкриває базові етапи експериментальної роботи: наводиться загальна логічно збудована блок-схема дослідження. Дисертант зрозуміло описує процес моделювання токсичного ураження тварин шляхом інтоксикації натрію нітритом і тютюновим димом, а також одночасна їх дія.

Крім цього використані методичні підходи дозволили оцінити вікові особливості метаболічних порушень у щурів за умов токсичного ураження натрію нітритом на тлі тютюнової інтоксикації, з'ясувати інтенсивність окиснювальних, енергозабезпечувальних та мембранодеструктивних процесів, функціонування ендогенної NO-системи та розвиток запалення.

Експерименти проведені на достатній кількості білих щурів, отриманих віварію Тернопільського медуніверситету. Експериментальні дослідження проведені на базі Центральної науково-дослідної лабораторії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України».

Всі етапи досліджень виконані згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та затверджені комісією з біоетики ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» (протокол № 30 від 1 вересня 2015 року).

В цілому, матеріали, які викладені дисертантом у другому розділі, характеризуються високим рівнем методичних підходів для виконання роботи.

Викладення власних результатів зроблено згідно загальної мети та поставлених завдань. Так, спочатку (*розділ 3*) досліджуються особливості метаболічних порушень у щурів різного віку після ураження їх натрію нітритом. Автором доведено, що ураження тварин різного віку натрію нітритом викликає активацію вільнорадикальних процесів, що підтверджується збільшенням в органах вмісту продуктів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів, а також посиленням процесу метгемоглобіноутворення, зниженням активності захисно-компенсаторних можливостей. Активація окиснювальних процесів в організмі тварин під впливом натрію нітриту призводить до утворення значної кількості вторинних ендогенних токсичних продуктів, що підтверджується підвищенням активностей амінотрансфераз, гама-глутамілтранспептидази у сироватці крові, збільшенням відсотку проникності мембрани еритроцитів, зниженням активності органоспецифічних ензимів у органах щурів. Отруєння щурів натрію нітритом також призводить до зниження енергозабезпечення тканин, про що свідчить зниження активностей

мітохондріальних ензимів – сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази в печінці, легенях та міокарді уражених щурів. Потрапляння в організм щурів натрію нітриту зумовлює розвиток запальних процесів в організмі, що підтверджується підвищенням вмісту С-реактивного протеїну у сироватці крові (у статевонезрілих тварин на 38 % через 72 год після отруєння) та вмісту прозапального цитокіну ІЛ-6 (у статевонезрілих та старечих щурів у 1,5 рази). Крім цього розвивається нітрооксидативний стрес, на що вказує підвищення активності індукцибельної NO-синтази та зниження ендотеліальної NO-синтази в печінці та сироватці крові тварин після отруєння, а також збільшення вмісту нітрит-іону у всіх органах. Слід відзначити, що найбільш чутливими до дії токсиканта виявились щури статевонезрілого та старечого віку.

В *розділі 4* приводяться результати вивчення впливу тютюнового диму на розвиток нітрооксидативного стресу. Здобувачем були виявлені та наведені в роботі статистично вірогідні результати, які вказують на пригнічення системи антиоксидантного захисту в організмі щурів. Поглиблення ендогенної інтоксикації в організмі щурів після отруєння тютюновим димом підтверджується збільшенням у сироватці крові маркерів токсемії.

Для з'ясування механізмів ураження щурів різного віку натрію нітритом на тлі тютюнової інтоксикації та корекції виявлених порушень антигіпоксантами та ентеросорбентами (*розділ 5*) були проаналізовані наслідки ураження щурів різних вікових груп. Проведені дослідження засвідчили наявність глибоких порушень в антиоксидантній системі, що проявляється пригніченням активності супероксиддисмутази та каталази, а також зниженням вмісту відновленого глутатіону. В ураженому організмі підвищується рівень церулоплазміну, що може бути однією із причин активації захисно-компенсаторних сил на ранніх етапах оксидативного стресу. Найбільш чутливими до одночасної дії токсикантів виявились

статевонезрілі щури. Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення під дією АФО призвела до посилення пероксидного окиснення ліпідів, окисної модифікації протеїнів, деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричинило структурні та метаболічні порушення у клітинах. Встановлено підвищення вмісту 2,4-ДНФГ як основного, так і нейтрального характеру у сироватці крові та органах тварин усіх вікових груп. Доведено, що за одночасного ураження щурів різного віку натрію нітритом та тютюновим димом розвивається нітрооксидативний стрес. Так, у сироватці крові та печінці прогресуюче зростала активність індукцибельної NO-синтази та знижувалась активність ендотеліальної NO-синтази у всіх вікових групах.

Для корекції виявлених порушень був застосований антигіпоксанти мілдронат, який проявив ефективний вплив на показники антиоксидантного захисту. Застосування карболайну призвело до зниження проявів ендогенної інтоксикації, але він виявився неефективним щодо антиоксидантної системи.

Аналіз та узагальнення результатів (*розділ 6*) викладено у відповідності до послідовності завдань роботи та окремих розділів власних досліджень. Ознайомлення з цим розділом дало відчуття цілісності виконаної роботи, високого наукового рівня. Автор володіє знанням сучасної наукової літератури, вміло описує та аналізує отримані результати.

Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями в цій галузі. Вони викладені послідовно, що свідчить про відповідні досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи.

Список використаних джерел складено згідно існуючих вимог, із чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань.

Повнота викладання матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Фактичні дані, а також теоретичні узагальнення повною мірою висвітлені в 37 наукових працях, з яких 18 у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, в тому числі 3 у міжнародних виданнях (3 – у журналах, які входять до наукометричної бази Web of Science, 1 – до бази «Scopus»), а також 10 – в збірках, матеріалах з'їздів та конференцій, 1 інформаційний лист, 1 патент України на корисну модель. Автореферат за змістом відповідає суті дисертаційної роботи, і в ньому відображено головні її положення.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення

Дисертація і автореферат написані логічно, з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення. Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено, проте є незначні зауваження:

1. На нашу думку, у вступі можна скоротити актуальність (4 ст), так як основну увагу можна було б зосередити на поєднаній патології, її поширеності та механізмах розвитку.
2. У розділі 2 «Матеріал та методи дослідження» недоцільно описувати загальновідомі методи. Можна навести тільки їх принципи з посиланням на першоджерело.
3. Розділ 5 власних досліджень дуже громіздкий і займає 107 сторінок. Морфологічні дослідження, на нашу думку, можна було б винести окремим розділом (шостим).
4. У роботі відсутні практичні рекомендації, які при такому об'ємі отриманих даних можна запровадити як у лабораторну практику, так і в клініку гострих отруень.

5. У роботі зустрічаються граматичні та стилістичні неточності, русизми.

Вказані недоліки носять рекомендаційний характер і не знижують загальної позитивної оцінки даної дисертаційної роботи.

Під час офіційного захисту, на нашу думку, варто обговорити наступні питання:

1. Який з використаних токсикантів (тютюновий дим чи натрію нітрит), на Вашу думку, відіграє першочергову роль у розвитку метаболічних порушень в ураженому організмі і чому ?
2. Чим пояснюєте Ваш вибір як коригуючого чинника препарату метаболічної дії мілдронату? Чому не мексидол, кверцетин, триметазидин? Який основний механізм дії даного лікарського засобу за змодельованого вами патологічного стану у тварин?
3. Чи існує взаємозв'язок між оксидативним, нітрооксидативним стресами в ураженому токсикантами організмі та розвитком запальних процесів? Як він проявляється?

Відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Лихацького П. Г. є самостійно виконаною, завершеною роботою, в якій отримано нові науково обґрунтовані результати, які у сукупності є суттєвими для науки і практики. Вона відповідає вимогам ДАК України за новизною отриманих результатів, їх теоретичною та практичною значимістю, високим рівнем узагальнень і висновків, а також технічним оформленням роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Петра Григоровича Лихацького за темою: “Вікові особливості метаболізму у щурів за дії натрію нітриту та тютюнового диму, шляхи корекції виявлених порушень” є завершеною, самостійно виконаною кваліфікаційною науковою роботою, яка

обґрунтовує нові підходи до корекції нітритно-тютюнової інтоксикації на підставі вивчення вікових особливостей прооксидантно-антиоксидантної системи, нітрооксидативного стресу, біоенергетичних процесів, маркерів ендогенної інтоксикації.

За змістом, актуальністю, науковою новизною та практичною значимістю дисертаційна робота відповідає чинним вимогам, викладеним в п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567 щодо докторських дисертацій, а її автор – Лихацький Петро Григорович заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Заступник директора з наукової роботи,

завідувач лабораторією цитогенетики

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної
медицини НАМН України»

доктор мед. наук, старший наук. співр.



Новікова С.М.

