

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Єфіменко Наталії Валентинівни на тему: «NO-залежна регуляція морфофункціонального стану тромбоцитів та еритроцитів крові за умов алкогольної інтоксикації» подану до захисту у спеціалізовану вчену раду К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність обраної теми

Алкоголізм – це складна хронічна хвороба, що характеризується психічними і фізичними змінами в організмі. Це одна з проблем сьогодення, для вирішення якої необхідне з'ясування молекулярних механізмів формування алкогольної залежності й шляхів ураження органів етанолвмісними речовинами та метаболітами їхнього окиснення в організмі.

Актуальним напрямком досліджень у клінічній біохімії є пошук ефективних фармакологічних антидотів, які у комплексній терапії здатні коригувати патологічний стан за умов алкогольної інтоксикації (АІ) шляхом блокування утворення вільних радикалів Оксигену, Нітрогену та інших активних сполук, що викликають прояв ефектів ендоінтоксикації. Використання донаторів оксиду нітрогену (NO) в медицині, як гепато- і кардіопротекторів, вказує на те, що NO-залежна система регуляції морфофункціонального стану різних клітин організму є особливою ланкою розробки терапевтичних засобів лікування алкоголізму та наслідків хронічної АІ. Важливим напрямом у з'ясуванні патогенезу алкогольної інтоксикації є дослідження функціонального стану системи крові. Тому, дисертаційна робота із з'ясування ролі системи оксиду нітрогену в патогенезі алкогольної інтоксикації та встановлення біохімічних змін в еритроцитах і тромбоцитах на тлі введення L-Arg – субстрату NOS, або L-NAME – неселективного інгібітора NOS є актуальною і має елементи новизни.

Дисертаційна робота Єфіменко Н.В. виконана на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка згідно плану науково-дослідної роботи за темами: “Структурно-функціональні та біохімічні характеристики компонентів крові за алкогольної інтоксикації” (№ держреєстрації 0107U007419, 2007-2009 рр.); “Структурно-функціональний стан еритроцитів і метаболітів за алкогольної інтоксикації” (№ держреєстрації

0110U005877, 2010-2012 pp.); “Структурно-функціональний стан гемоглобіну за алкогольної інтоксикації та дії фізіологічно активних речовин” (№ держреєстрації 0113U000876, 2013-2015 pp.); “Фізико-хімічна характеристика та функції лігандних форм гемоглобіну за патологій різної етіології” (№ держреєстрації 0116U001675, 2016-2018 pp.).

Мета і завдання досліджень сформульовані методично грамотно, вони побудовані з урахуванням результатів, які одержані іншими дослідниками і встановлених фактів, що дозволило автору визначити пріоритетні напрями і нез’ясовані питання.

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

Основні наукові положення дисертації випливають із отриманих наукових і практичних результатів експериментальних досліджень, ґрунтуються на їх глибокому аналізі та узагальненні. Ряд наукових положень дисертаційної роботи сформульовані вперше, що свідчить про новизну, вказує на теоретичне і практичне значення одержаних результатів. Зокрема, дисертантом вперше науково обґрунтовано та експериментально перевірено на модельних тваринах стратегію корекції ускладнень АІ, пов’язаної з порушенням біосинтезу NO в еритроцитах і тромбоцитах. Зокрема, доведено коригувальний вплив L-аргініну на систему антиоксидантного захисту клітин крові, нормалізацію рівня еритропоезу та агрегаційної здатності еритроцитів, зростання активності ендотеліальної NOS еритроцитів, відновлення спорідненості гемоглобіну до кисню у щурів з АІ. Вперше встановлено, що споживання L-аргініну запобігає розвитку оксидативно-нітрозативного стресу в еритроцитах і тромбоцитах периферичної крові щурів. Тому, отримані дисертантом дані можуть лягти в основу розробки нових терапевтичних підходів і фармакологічних препаратів для комплексної корекції ускладнень за алкогольної інтоксикації, які супроводжуються порушеннями системи L-аргінін/NO.

Важливою особливістю наукових розробок дисертаційної роботи є комплексне вивчення теоретичних питань у взаємозв’язку з потребами медицини. На це вказують висновки, що приведені у дисертації та авторефераті.

Серед усіх висновків (11), що подані в дисертації (ст. 155–157) та авторефераті (ст. 14–15), перший викладений у вигляді узагальнення власних експериментальних даних, а інші відображають одержані автором результати експериментальних досліджень. Викладення фактичного матеріалу дисертації здійснено на 186 сторінках комп'ютерного тексту, включно з анотацією на укр. і англ. мовах (2-8 ст.) та списком наукових праць, опублікованих за темою дисертації (8-13 ст.), що включає 25 робіт, з яких 9 – статей і 16 – тез доповідей. Структура роботи побудована відповідно до ДСТУ 3008-95 згідно “Порядку присудження наукових ступенів”, а також наказу МОН України №40 від 12.01.2017 р. і містить усі необхідні розділи: вступ (19-27 ст.), аналітичний огляд літератури (28-58 ст.), матеріали та методи досліджень (59-88 ст.), результати досліджень (89-135 ст.), аналіз та узагальнення результатів досліджень (136-154 ст.), висновки (155-157 ст.) та список використаних джерел (158-186 ст.).

У **вступній частині** дисертації автор дає літературний і власний науковий аналіз та обґрунтування вибраної теми, її актуальності, наводить зв'язок роботи з державною науковою тематикою, ставить мету і завдання досліджень, розкриває наукову новизну одержаних результатів, їх теоретичне і практичне значення, висвітлює особистий внесок у процесі виконання роботи, апробацію результатів, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У **літературному огляді** автор дисертації використовувала переважно літературні джерела останніх 5-10 років. Аналізуються вітчизняні та зарубіжні публікації, що достатньо повно розкривають суть поставленої мети і завдань виконаних досліджень, вони глибоко проаналізовані і раціонально використані. У цьому розділі в певній послідовності проаналізовані літературні джерела, що характеризують особливості етіології і патогенезу алкогольної інтоксикації, структурно-функціональні особливості еритроцитів і тромбоцитів у нормі та за умов алкогольної інтоксикації, роль біологічних систем L-аргінін/оксид нітрогену та антиоксидантного статусу в клітинах крові за умов алкогольної інтоксикації. Зібрані та цитовані наукові публікації добре опрацьовані, ретельно проаналізовані та критично співставленні у літературному огляді при аналізі та узагальненні власних досліджень і повно викладені у списку посилань дисертації. Наукова оцінка прове-

деного аналізу літературного огляду дає підстави вважати, що Єфіменко Н.В. добре володіє сучасною науковою літературою, здобула достатній обсяг знань з на-пряму досліджень за темою дисертаційної роботи, які вміло використані для аналізу літературних даних та узагальнення одержаних результатів.

Проведений аналіз другого розділу «Матеріали і методи досліджень» показав, що експериментальна частина дисертаційної роботи виконана на самцях нелінійних безпородних щурів (вид *Rattus norvegicus*), попередньо відібраних за допомогою “двопляшкового методу”, для виявлення їхньої схильності до EtOH. Надалі для досліджень використовували тварин, які надавали перевагу розчину EtOH. Щурі були розподілені на 6 груп: перша – контроль, друга – контрольні тварини, яким вводили L-аргінін, третя – контрольні тварини, яким вводили L-NAME, четверта – тварини з експериментальною AI, п’ята – тварини з AI, яким вводили L-аргінін, шоста – тварини з AI, яким вводили L-NAME. Модель експериментальної AI у щурів створювали щоденним введенням 20 % розчину EtOH *per os* протягом 14 діб за допомогою зонду з медичної сталі з розрахунку 6 г на 1 кг маси тіла.

У процесі виконання роботи використані сучасні біохімічні, фізико-хімічні, електронно-мікроскопічні, спектрофотометричні, цитологічні та статистичні методи. Відносно методики і методів досліджень принципових зауважень не відмічено.

Розділ 3 «Результати досліджень» представлений сімома підрозділами. У першому підрозділі представлені дослідження впливу L-аргініну та L-NAME на морфофункціональний стан тромбоцитів за умов алкогольної інтоксикації. Дисертантом виявлено зниження кількості тромбоцитів, пригнічення їх агрегації та характерні ознаки преактивації клітин за AI. Споживання L-аргініну та L-NAME алкоголізованими тваринами викликало збільшення кількості тромбоцитів та підвищення їх агрегаційної здатності, появу більшої частки активованих тромбоцитів за споживання L-аргініну, однак, за споживання L-NAME відбувалося посилене утворення α -гранул і зменшення кількості щільних тілець.

У другому підрозділі досліджувалися показники антиоксидантного захисту тромбоцитів у контролі, за умов алкогольної інтоксикації та на фоні споживання

L-аргініну або L-NAME. За умов АІ в тромбоцитах крові щурів виявлено посилення оксидативно-нітрозативного стресу. За споживання тваринами з АІ L-аргініну встановлено нормалізацію показників системи АОЗ, а саме: підвищення активності каталази, СОД та сумарної активності NOS. Споживання алкоголізованими тваринами L-NAME мало позитивний коригуючий ефект на активність ензимів АОЗ, але меншою мірою, ніж за умов споживання L-аргініну.

У третьому підрозділі досліджено вплив L-аргініну та L-NAME на стан периферичної ланки системи еритрону крові щурів за АІ. Встановлено, що за АІ зменшується добова продукція ретикулоцитів, знижується кількість еритроцитів, збільшується популяція «фізіологічно старих» форм. Застосування L-аргініну за умов АІ збільшувало кількість циркулюючих ретикулоцитів, еритроцитів, частки фізіологічно «зрілих» та «юних» еритроцитів, зменшувало кількість «фізіологічно старих», що свідчить про інтенсифікацію роботи еритрону.

У четвертому підрозділі представлені дослідження стійкості еритроцитів до кислотного гемолітика за умов алкогольної інтоксикації. Зокрема, дисертантом встановлено збільшення частки швидко прогемолізованих еритроцитів та зменшення часу максимального їх гемолізу. У тварин з АІ споживання L-аргініну зумовлювало зменшення частки зруйнованих еритроцитів та збільшення часу максимального й загального гемолізу, що свідчить про появу стійкіших до дії кислотного гемолітика молодих еритроцитів і вказує на стабілізуючу дію цього чинника на еритроцитарні мембрани. Встановлено часткове зростання резистентності еритроцитів за умов споживання L-NAME у щурів з АІ, що свідчить про мембранопротекторну дію цієї сполуки на функціональні параметри мембран клітин.

У п'ятому підрозділі представлені дослідження агрегації еритроцитів та визначення вмісту сіалових кислот у складі глікокон'югатів їхніх мембран. Отримані дисертантом результати вказують на десіалування еритроцитів за умов АІ. Зниження негативного заряду супроводжується підвищенням природної агрегації еритроцитів, що свідчить про порушення реологічних властивостей крові (змін в'язкості і структури крові) та, як наслідок, ініціації процесу тромбоутворення. Споживання тваринами L-аргініну за АІ виявляло нормалізуючий вплив на функ-

ціональний стан еритроцитів. Споживання L-NAME за умов АІ не супроводжувалося достовірними змінами.

У шостому підрозділі представлено фізико-хімічні характеристики та функціональні властивості гемоглобіну за умов АІ та за впливу L-аргініну і L-NAME. Збільшення вмісту EtOH, АцА та продуктів їхнього метаболізму за умов АІ призводить до розвитку хронічної гіпоксії, за якої знижується частка HbO₂, проте збільшується вміст MetHb та лужностійкого гемоглобіну, зростання нітритредуктазної активності дезоксигемоглобіну (RHb). Проте, споживання L-аргініну за умов АІ викликало підвищення частки HbO₂ й зниження кількості MetHb, частки HbF та незначного зменшення нітритредуктазної активності RHb. Крім цього, дисертантом виявлено, що час переходу RHb у нітрозилгемоглобін (NOHb) за умов АІ зростає. У разі споживання тваринами з АІ L-аргініну швидкість нітрузування RHb зростала. Споживання щурами з АІ неселективного інгібітора L-NAME призводило до сповільнення переходу RHb в HbNO.

У сьомому підрозділі представлені дослідження активності ензимів АОЗ й вміст продуктів ПОЛ в еритроцитах щурів з АІ за споживання L-аргініну та L-NAME. Дисертантом встановлено, що за АІ відбувається посилення оксидативно-нітрозативного стресу в еритроцитах периферичної крові щурів, що зумовлено зростанням активності індукцибельної NOS на тлі зниження сумарної активності NOS, зниженням кількості NO₂⁻, збільшенням – NO₃⁻, а також збільшенням концентрації сечовини, продуктів ПОЛ та ОМБ нейтрального та основного характеру на тлі зниження каталазної та супероксиддисмутазної активності. За споживання L-аргініну тваринами з АІ відбувалося зростання сумарної активності NOS, вмісту NO₂⁻ та зниження рівня сечовини в гемолізатах еритроцитів. Споживання L-аргініну та L-NAME тваринами за АІ призводило до підвищення активності ензимів АОЗ, зменшення вмісту продуктів ПОЛ та ОМБ.

Розділ 4 «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» викладений на 19 сторінках, містить системний аналіз одержаних результатів власних досліджень у співставленні з даними літератури. У цьому розділі автором проведено обговорення виявлених змін основних показників, значення їх для з'ясування механізмів NO-залежної регуляції морфофункціонального стану тромбоцитів і

еритроцитів за умов ураження етанолвмісними речовинами та метаболітами їхнього окиснення в організмі. Оцінюючи результати досліджень та їх обговорення, як найвагомішу частину роботи, необхідно вказати на проведений дисертантом глибокий науковий аналіз отриманих даних. На основі вивчення цих матеріалів можна стверджувати, що викладені в дисертаційній роботі результати достатньо науково опрацьовані на відповідному методичному рівні, виконаний їх статистичний аналіз. Це дало дисертанту підстави зробити науково-обґрунтовані **висновки**, які впливають з представленого в дисертації фактичного матеріалу і результатів власних досліджень.

Список літератури оформлений згідно вимог, містить 262 джерела, з яких 125 – кирилицею та 137 – латиницею, причому 37% літературних джерел опубліковані за останні п'ять років.

Текст дисертації ілюстрований 17 рисунками та 15 таблицями. Таблиці та рисунки виконані якісно, добре документують, ілюструють і підтверджують експериментальні дані та доповнюють текстовий матеріал дисертаційної роботи.

Повнота викладу результатів досліджень в опублікованих працях та їх апробація.

Детальний аналіз дисертаційних матеріалів, проведений при їх рецензуванні, свідчить, що результати наукової роботи Єфіменко Н.В. є підсумком проведених нею досліджень, які впродовж періоду їх виконання всебічно аналізувалися і висвітлені у 9 наукових статтях і 16 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів, конференцій та конгресів. Основні положення дисертації науково аргументовані та в повній мірі відображені в наукових працях.

Автореферат дисертації за змістом ідентичний дисертаційній роботі і висвітлює основні її положення. Дисертація та автореферат оформлені на належному рівні, написані державною мовою.

Висловлюючи позитивну оцінку дисертаційної роботи в цілому, необхідно вказати на деякі недоліки та упущення, що були виявлені в період її вивчення:

1. Було б доцільним при написанні дисертації однотипове вживання хімічної термінології щодо назв елементів та протеїнів, бажано нової української, оскільки у дисертації вживається поряд з «Нітрогеном» і «Оксигеном», «ак-

тивні форми кисню» і «активні форми азоту» (ст. 20); «оксид азоту» (ст. 21), далі «метаболіти оксиду Нітрогену» (ст. 23), а в переліку умовних позначень (ст.18) – нітрогену оксид(II); у назві методики 2.13.1. – «визначення рівня окисної модифікації протеїнів», а в тексті методики вживається «в процесі окиснювальної модифікації білків» (ст. 82).

2. У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» зайвим є п. 2.3. «Об'єкт досліджень» (ст.61), оскільки аналогічне визначення вже є у вступі дисертації.

Поряд з тим, у процесі аналізу матеріалів дисертації виникли окремі питання до здобувача:

1. Незрозуміло чому використовувалися різні концентрації етанолу у дослідженнях на щурах: при виявленні їхньої схильності до EtOH – 15 % розчин, а модель експериментальної АІ створювали щоденним введенням 20 % розчину EtOH (в 1,3 раза більша концентрація)? Оскільки середньотоксичні дози EtOH знаходяться в межах 5-15 г/кг (59 ст.), у методиці немає обґрунтування чому для досліджень вибрали саме 6 г/кг?
2. У методиці досліджень незрозуміло як формували контрольні групи тварин, чи це був чистий контроль, чи відбирали їх з тих тварин, які мали схильність до EtOH? Якщо так, то необхідно вказати за який час після перевірки тварин на схильність до EtOH щури формувалися у контрольні і дослідні групи основного експерименту? Як Ви вважаєте, чи може мати вплив на досліджені показники щурів контрольної групи схильність їх до алкоголю?
3. Скільки тварин було використано у дисертаційних дослідженнях загалом і скільки їх було у кожній групі, оскільки про це не відзначено у розділі «Матеріали і методи» дисертації?
4. У п.3.6.2 «Вплив L-аргініну та L-NAME на кисеньзв'язувальну функцію гемоглобіну» на 121 ст. представлені дані (табл. 3.11) ступеня насичення гемоглобіну киснем крові здорових донорів за умов дії різних концентрацій АцА. Прошу уточнити, де саме брали кров здорових донорів, їх стать і вік, на яких проводили дослідження, оскільки це не відзначено у розділі «Матеріали і методи» дисертації? А якщо це є дані інших авторів, то чому немає посилань на ці роботи?

На перспективу дисертанту бажаю продовжити роботу за обраним напрямом досліджень і, можливо, для повної картини стану еритроцитопоезу за АІ, крім ретикулоцитів і еритроцитів, дослідити і їх попередники – клітини червоного кісткового мозку. Крім цього, важливо було б дослідити і морфо-функціональні зміни лейкоцитів, оскільки при їх активації за кисневого вибуху, важливу роль відіграють саме оксид нітрогену та iNOS.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи й автореферату Єфіменко Н.В. на тему «NO-залежна регуляція морфофункціонального стану тромбоцитів та еритроцитів крові за умов алкогольної інтоксикації» необхідно відзначити, що дисертація є самостійною завершеною науковою працею, в якій доведено нормалізуючий вплив L-аргініну на морфофункціональний стан еритроцитів та тромбоцитів крові щурів за умов алкогольної інтоксикації. Отримані дисертантом результати можуть лягти в основу розробки нових фармакологічних препаратів з використанням цієї амінокислоти для комплексної терапії алкогольної інтоксикації.

Дисертаційна робота за актуальністю тематики досліджень, обсягом і науково-методичним рівнем їх виконання, новизною та науковою обґрунтованістю одержаних результатів і викладених положень відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 року, які ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор Єфіменко Н. В. заслуговує здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент

Доктор біологічних наук, ст.н.співр.,
заступник директора з наукової роботи
Інституту біології тварин НААН,
завідувач лабораторії біохімії
адаптації та онтогенезу тварин

Р.Я. Іскра

Підпис Р.Я. Іскри засвідчую:
провідний фахівець ВК
Інституту біології тварин НААН, канд. с.-г. наук
23.05.2017 р.



І.В. Невоструєва