

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Єфіменко Наталії Валентинівни** на тему: **"NO-залежна регуляція морфофункціонального стану тромбоцитів та еритроцитів крові за умов алкогольної інтоксикації"**, що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія

### *1.Актуальність обраної теми.*

На сьогоднішній день в Україні та багатьох країнах світу надзвичайно актуальною є проблема поширення алкоголізму серед населення. В основі розвитку цього захворювання лежать глибокі зміни метаболізму, що призводять до порушень біогенезу, структури та функції клітин різних органів та систем людини. За умов хронічної алкогольної інтоксикації розвиваються дисфункціональний стан, стійкі соматоневрологічні розлади, психічна деградація, відбуваються порушення функцій органів і систем, зокрема нервової системи, органів травлення і кровообігу, судинні розлади, пригнічення резистентності організму до дії несприятливих чинників.

З літературних джерел відомо, що одним з ключових механізмів пошкодження клітин є підвищення рівня утворення активних форм кисню, які залучені в розвиток патологій, пов'язаних з оксидативним стресом. Активні форми кисню є ініціаторами реакцій вільнорадикального окиснення, які викликають окиснювальну модифікацію ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, що в ході розвитку патологічного процесу може призводити до загибелі клітини по апоптотичному або некротичному механізму. На сьогодні в літературі існує гіпотеза, що порушення перекисного гомеостазу на фоні недостатнього функціонування антиоксидантної системи і оксиду азоту є головною ланкою розвитку оксидативного стресу. Це може бути причиною цілого комплексу патологічних змін, які зумовлюють метаболічні розлади на рівні клітини. Формування оксидативно-нітрозативного стресу виявлено при різних екзогенних інтоксикаціях, до яких відноситься і зловживання алкоголем, що є значною медико-соціальною проблемою. Сьогодні маємо багато даних щодо тісної взаємодії продукції вільних

радикалів кисню та оксиду азоту, здійснюється інтенсивне вивчення механізмів біологічної дії етанолу на організм людини і тварин, проте, окремі результати виявляються суперечливими. Крім того, ряд аспектів цієї проблеми залишається нез'ясованим, зокрема, практично відсутні комплексні дослідження системи кровотворення за умов алкогольної інтоксикації. З'ясування біохімічних механізмів розвитку алкогольної залежності дозволить провести науково обґрунтований пошук нових ефективних лікувальних засобів, спрямованих на компенсацію окремих реакцій організму, а також засобів діагностики та профілактики, які здатні регулювати найбільш чутливі ланки загальних метаболічних процесів в організмі за умов розвитку алкоголізму.

Дане дослідження є дуже актуальним і має важливе значення для розуміння біохімічних механізмів порушення NO-залежної регуляції у клітинах периферичної ланки системи крові і закладає теоретичні основи створення фармакологічних препаратів нового покоління для наукової обґрунтованої корекції алкогольіндукованого оксидативно-нітрозативного стресу.

## ***2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.***

Дисертаційна робота виконана згідно планів наукових досліджень кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка і є фрагментом комплексних тем, таких як “Структурно-функціональні та біохімічні характеристики компонентів крові за алкогольної інтоксикації” (№ держреєстрації 0107U007419, 2007-2009 рр.); “Структурно-функціональний стан еритроцитів і метаболіти за алкогольної інтоксикації” (№ держреєстрації 0110U005877, 2010-2012 рр.); “Структурно-функціональний стан гемоглобіну за алкогольної інтоксикації та дії фізіологічно активних речовин” (№ держреєстрації 0113U000876, 2013-2015 рр.); “Фізико-хімічна характеристика та функції лігандних форм гемоглобіну за патологій різної етіології” (№ держреєстрації 0116U001675, 2016-2018 рр.).

### ***3. Ступінь обґрунтованості основних положень і висновків сформульованих у дисертації.***

Сформульовані Єфіменко Н.В. основні наукові положення та висновки обґрунтовані достатньою кількістю експериментальних досліджень та підтверджуються всією сукупністю результатів досліджень, отриманих та обговорених із залученням літературних даних вітчизняних та зарубіжних джерел.

Перелічене вище дозволяє оцінити одержані результати наукового дослідження, основні наукові положення і висновки як обґрунтовані.

### ***4. Достовірність основних наукових положень, висновків, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.***

Основні наукові положення та висновки даної дисертаційної роботи ґрунтуються на експериментальних даних, отриманих при використанні адекватних щодо поставлених завдань методів: біохімічних, фізико-хімічних (трансмісійна та сканувальна) електронна мікроскопія, абсорбційна спектроскопія, цитологічних та методів статистичного аналізу. Автором було досліджено функціональний стан L-аргінін/NO системи (активність ізоформ NOS: ендотеліальної, індукцйбельної, конститутивної; рівень метаболітів оксиду (II) Нітрогену:  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) еритроцитів і тромбоцитів; функціональний стан системи антиоксидантного захисту (активність супероксиддисмутази, каталази; рівень метаболітів перекисного окиснення ліпідів: ТБК-ПП, ДК) еритроцитів і тромбоцитів; цитологічні особливості еритроцитів і тромбоцитів (агрегаційна здатність, ультраструктура тромбоцитів, поліморфізм еритроцитів); дихальна функція системи крові (лігандні форми гемоглобіну, спорідненість Нв до кисню, спектральна характеристика Нв та  $\text{NOHb}$ , спорідненість гемоглобіну до кисню) за алкогольної інтоксикації та на тлі активації й інгібування NO-синтази.

Перелічене вище дозволяє оцінити одержані результати, основні наукові положення та висновки глибоких за змістом досліджень, проведених Єфіменко Н.В. як достовірні.

Дослідження проводились відповідно до закону України №3447 IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” ухваленого Верховною Радою України (протокол № 2 від 16.02.2015 засідання комісії з питань біоетики ЛНМУ імені Данила Галицького), згідно з національними „Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах”, ухваленими Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями міжнародних принципів „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1986)

***5. Новизна основних наукових положень, висновків, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів.***

Єфіменко Н.В. вперше проведено комплексні порівняльні дослідження біохімічних механізмів, які залучені в патогенез алкогольної інтоксикації та науково обґрунтовані шляхи корекції виявлених порушень. В результаті проведених досліджень була визначена роль процесів нітрузування і нітрозилування гемоглобіну, ензиматичної системи антиоксидантного захисту, різних ізоформ NO-синтази у розвитку метаболічних порушень за умов цієї патології. Виявлено, що за умов алкогольної інтоксикації інгібується активність ензимів антиоксидантного захисту (СОД, каталази) та знижується активність NOS, змінюється вміст стабільних продуктів метаболізму оксиду азоту й продуктів ПОЛ. Показано, що застосування L-аргініну (основного субстрату NO-синтази) сприяло відновленню фізіологічного рівня еритропоезу та нормалізації агрегаційної здатності еритроцитів периферичної крові, підвищувало ефективність функціонування системи антиоксидантного захисту еритроцитів і тромбоцитів алкоголізованих щурів, відновлювало спорідненість Нв до кисню, модулює функціональний стан системи L-аргінін/NO та сприяє відновленню функцій клітин (еритроцитів і тромбоцитів) периферичної ланки крові та запобігає розвитку оксидативно-нітрозативного стресу.

В роботі науково обґрунтовано й експериментально доведено вплив L-аргініну на систему антиоксидантного захисту еритроцитів і тромбоцитів

щурів за умов алкогольної інтоксикації з АІ (нормалізація активності СОД і каталази).

### ***6. Практичне значення одержаних результатів.***

Отримано узагальнюючі положення про базисні біохімічні механізми, загальні закономірності і особливості розвитку оксидативно-нітративного стресу, що опосередковують зміни морфологічного й функціонального стану тромбоцитів та еритроцитів. Дослідження таких процесів дає можливість зрозуміти ключові механізми, які залучені в патогенез алкогольної інтоксикації і закладає теоретичні та практичні основи створення фармакологічних препаратів нового покоління. На основі отриманих результатів для корекції патологічного стану, пов'язаного з порушенням утворення NO в організмі за умов алкогольної інтоксикації автором доведено, що застосування L-аргініну сприяє нормалізації активності eNOS тромбоцитів і еритроцитів, запобігає виникненню деформації мембранного ліпопротеїнового комплексу й руйнуванню бішару внаслідок усунення вільнорадикального пошкодження мембран еритроцитів, підвищує ефективність депонування NO і нормалізує функціональні властивості гемоглобіну та співвідношення його лігандних форм, а отже, виявляє цитопротекторні властивості у клітинах периферичної ланки системи крові.

Практичне значення отриманих результатів полягає в обґрунтуванні біохімічних механізмів розвитку ускладнень за умов алкогольної інтоксикації з акцентуванням уваги на роль системи оксиду азоту. Отримані результати можуть у подальшому знайти застосування у практичній наркології і психології, а також бути використаними у навчальному процесі при підготовці студентів біологів та медиків.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджено для викладання спецкурсів “Функціональна біохімія”, “Метаболізм ксенобіотиків”, “Біохімія оксидативно-нітративного стресу”, “Біохімія крові”, “Лабораторна діагностика у клініці та експерименті”, “Молекулярні механізми патологічних процесів” кафедри біохімії ЛНУ імені Івана Франка, а також для лабораторних занять.

## ***7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків і опублікованих працях та в авторефераті.***

Дисертант є автором 25 праць за темою дисертаційної роботи: 9 статей в тому числі 7 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених ДАК України за біологічним напрямом та 2 – у інших виданнях; 16 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових з'їздах, конференціях та конгресах.

Наукові положення, висновки, які сформульовані в дисертації достатньо повно відображені в опублікованих роботах та авторефераті. Всі розділи автореферату повторюють матеріали дисертаційної роботи, де у лаконічній формі викладено основні положення, висновки та отримані результати. Автореферат дисертації оформлений згідно вимог ДАК України.

Матеріали дисертаційної роботи Єфіменко Н.В. пройшли апробацію на наукових конференціях, з'їздах, конгресах, симпозіумах в Україні та за кордоном.

## ***8. Структура дисертації.***

Дисертація побудована у традиційному стилі, включає: вступ, аналітичний огляд літератури, матеріалів і методів досліджень, розділ результатів досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел.

У "Вступі" переконливо обґрунтовується необхідність проведення даного дослідження, чітко визначено його мету і задачі, виділено наукову новизну і практичне значення роботи, апробація та впровадження результатів дослідження.

В розділі "Аналітичний огляд літератури", який складається з 5 підрозділів, представлено глибокий системний аналіз літературних джерел відносно молекулярно-біохімічних механізмів залучених в патогенез алкогольної інтоксикації. Надано вичерпну інформацію про функціонування системи L-аргінін/оксид азоту і структурно-функціональні особливості еритроцитів і тромбоцитів у нормі та за умов алкогольної інтоксикації. Розглянуто існуючі гіпотези щодо NO-залежної регуляції функціональних особливостей гемоглобіну. Зроблено детальний аналіз наявних нових фактів

та уявлень про антиоксидантний статус і приділена увага особливостям метаболічних процесів клітин крові за умов алкогольної інтоксикації.

Розділ "Матеріали і методи дослідження" написано кваліфіковано. Детально викладено схеми досліджень, коректно обрано модель алкогольної інтоксикації і науково обґрунтовано дозу застосування етилового спирту.

Для поглибленої оцінки змін в клітинах периферичної крові, біохімічні дослідження були доповнені морфологічними, цитологічними та фізико-хімічними. Проведена серія експериментів надала можливість автору з'ясувати біохімічні механізми, які опосередковують зміни морфологічного та функціонального стану еритроцитів і тромбоцитів за умов алкогольної інтоксикації та науково обґрунтувати відповідні засоби корекції виявлених порушень.

Дисертантом проведений виключно великий об'єм експериментальних досліджень і підтверджено методами статистичного аналізу.

В розділі "Результати досліджень", який складається з 7 підрозділів наведені результати власних досліджень, які відповідають поставленим завданням і меті роботи. Розкрито біохімічні механізми участі NO, процесів нітрузування і нітрозилування гемоглобіну, ензиматичної системи антиоксидантного захисту, різних ізоформ NO-синтази у розвитку метаболічних порушень в патогенезі алкогольної інтоксикації і обґрунтовано шляхи корекції виявлених порушень. Досліджено вплив субстрату L-аргініну і неселективного інгібітора NO-синтази L-NAME на клітинні елементи периферичної крові і показано, що за умов алкогольної інтоксикації порушується ультратонка організація тромбоцитів, що відображається у зміні їхньої агрегаційної здатності, знижується ефективності еритропоезу, зменшується загальна кількість еритроцитів, знижується вміст ретикулоцитів периферичної крові, збільшується кількість дегенеративних форм еритроцитів та кількості фізіологічно старих клітин. Автором виявлено зниження вмісту мембранозв'язаних сіалових кислот еритроцитів, що призводило до зміни заряду поверхні глікокаліксу і, як результат, до зниження показника максимального ступеня альціаніндукованої агрегації.

Важливо зазначити, що при алкогольній інтоксикації в еритроцитах знижувалася сумарна активність NO-синтази і змінювалося співвідношення активності ендотеліальної та індукцйбельної її ізоформ. Автором проведено аналіз кривих деоксигенації оксигемоглобіну і встановлено, що при алкогольній інтоксикації відбувається зниження спорідненості Hb до кисню, що підтверджено зміною показника P50. У периферичній крові алкоголізованих тварин змінюється співвідношення лігандних форм гемоглобіну, зростає нітритредуктазна активність RHb і сповільнюється перехід дезоксигемоглобіну в нітрозозоформу. Автором були проведені комплексні порівняльні дослідження впливу субстрату L-аргініну і неселективного інгібітора NO-синтази L-NAME на досліджувані процеси як в контрольній групі тварин так і за умов алкогольної інтоксикації і встановлено, що для корекції виявлених порушень використання L-аргініну сприяє нормалізації активності eNOS тромбоцитів і еритроцитів, запобігає виникненню деформації мембранного ліпопротеїнового комплексу й руйнуванню бішару внаслідок усунення вільнорадикального пошкодження мембран еритроцитів, підвищує ефективність депонування NO і нормалізує функціональні властивості гемоглобіну та співвідношення його лігандних форм, а отже, виявляє цитопротекторні властивості.

У розділі "Аналіз та узагальнення результатів дослідження" автор оцінює та зіставляє дані, враховуючи сучасні уявлення про біохімічні механізми патогенезу алкогольної інтоксикації і роль системи L-аргінін/NO в цих процесах і дана оцінка процесів ліпопероксидації та ензимів антиоксидантного захисту.

На основі отриманих даних автором наведено 3 блок - схеми біохімічних змін процесів, що вивчалися при алкогольній інтоксикації (гіпотетична модель гематотоксичної дії етанолу, схема причинно-наслідкових зв'язків зміни морфофункціонального стану еритроцитів у відповідь на оксидативно-нітрозативний стрес за алкогольної інтоксикації і гіпотетична узагальнююча схема біологічних ефектів впливу алкогольної інтоксикації та роль L-аргініну або L-NAME).



Основні положення дисертаційної роботи відображені у 11-ти висновках, які логічно витікають з отриманих результатів, дають відповіді на питання, поставлені дослідником.

Таким чином, у дисертаційній роботі Єфіменко Н.В. з використанням сучасних методів досліджень біохімічних процесів науково обґрунтовані біохімічні механізми, які залучені в патогенез алкогольної інтоксикації і визначені основні шляхи для направленої фармакологічної корекції.

Основу даної роботи складають науково обґрунтована робоча концепція та унікальний фактичний матеріал, який має глибоку доказову базу.

### ***9. Недоліки дисертації та автореферату щодо їхнього змісту та оформлення.***

Оцінюючи дисертаційну роботу Єфіменко Н.В. в цілому позитивно, необхідно відзначити деякі зауваження і питання, які виникли в процесі рецензування роботи, проте вони не мають принципового значення для її загальної характеристики.

#### *Запитання до роботи.*

1. Як можна пояснити, однонаправлене зростання ступеня агрегації тромбоцитів за умов застосування як L-аргініну, так і L-NAME при алкогольній інтоксикації?

2. Чому в контрольній групі щурів застосування L-аргініну призводить до зростання вмісту метаболітів оксиду азоту на фоні незмінної активності NO- синтази, а зниження активності ферменту при застосуванні L-NAME не призводить до змін сумарного вмісту метаболітів оксиду азоту?

3. Чому активність iNOS при застосуванні L-NAME перевищує контрольні показники на відміну від групи тварин з алкогольною інтоксикацією?

Висловлені зауваження не знижують позитивної оцінки дисертації в цілому, а також розроблених автором основних наукових положень, висновків та отриманих результатів проведених досліджень.

## **Висновок**

Дисертаційна робота Єфіменко Наталії Валентинівни "НО-залежна регуляція морфофункціонального стану тромбоцитів та еритроцитів крові за умов алкогольної інтоксикації", яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук є фундаментальним науковим дослідженням і відповідає вимогам п.п. 11, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія.

Офіційний опонент

заступник директора з наукової роботи  
ННЦ "Інститут біології та медицини"  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник

О.В.Сокур

