

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Нетроніної Ольги Володимирівни на тему «Сіалові кислоти плазми та сіалюваність лімфоцитів при хронічних лімфо- і мієлопроліферативних захворюваннях крові», поданої до офіційного захисту в спеціалізовану вчену раду К. 58.601.04 при ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія

1. Актуальність теми дисертаційної роботи.

В Україні захворюваність на лейкоз становить 7,7 осіб на 100 тис. населення на рік, у тому числі на хронічний мієлолейкоз 1-1,5 особи, тобто 15-20 % від усіх випадків гемобластозів у дорослих. В-клітинний хронічний лімфолейкоз становить 30% всіх типів лейкемій. Хворіють на лімфо- та мієлопроліферативних захворюваннях крові переважно люди середнього віку: пік захворюваності припадає на вік 30–50 років, близько 30 % становлять хворі віком понад 60 років. Чоловіки хворіють дещо частіше за жінок (співвідношення 1 : 1,5). Лейкози загалом, за даними ВООЗ, у розвинутих країнах спричиняють близько 1 % смертності, а в Україні сягають 5 %.

Загально відомо, що сіалові кислоти – ацильовані похідні нейрамінової кислоти, виявлені в усіх тканинах і рідинах організму; на сьогоднішній день їх налічується понад 40 видів. Сіалові кислоти входять до складу молекул олігосахаридів, гліколіпідів і глікопротеїнів, а також є важливими компонентами багатьох біологічно активних сполук — ферментів, гормонів, рецепторних білків. Сіаловмісні глікопротеїни беруть участь у процесах міжклітинної взаємодії, специфічної рецепції на поверхні клітин, передачі сигналів, транспорті іонів, забезпеченні антигенної специфічності та тканинної сумісності. У плазмі крові сіалові кислоти входять у склад фібриногену, гаптоглобіну, церулоплазміну, α 1кислого глікопротеїну, трансферину. Вони також присутні у складі мембран еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів. Власне від їх кількості залежить тривалість життя цих клітин. Відомо, що відмінності у складі й будові сіалових компонентів можуть визначати різноманітні функції

клітин. Наприклад, міграцію лімфоцитів до місць запалення або схильність до захворювання, викликаного тим чи іншим штамом вірусу за специфічністю до $\alpha 2-6$ та $\alpha 2-3$ – сіалових залишків.

Дані літератури вказують на те, що при хронічних лімфо- та мієлопроліферативних захворюваннях крові змінюється рівень та структура плазмових і поверхневих форм глікопротеїнів, що може бути пов'язано з якісними та кількісними змінами сіалових кислот. Під час злоякісної трансформації аномальне глікозилювання є характерною особливістю ракових клітин, а зміни сіальованості тісно пов'язані з метастатичним потенціалом. Важливим є те, що сильно сіальована клітина є «невидимою» для імунної системи, що веде до відсутності впливу імуноглобулінів і цитокінів щодо пухлинних тканин.

Отже, на сьогоднішній день молекулярні механізми, що призводять до зміни концентрації сіалових кислот та сіальованості глікопротеїдів при хронічних лімфолейкозах залишаються нез'ясованими. Невідомо також, чи впливає застосування цитостатиків на вміст сіалових кислот, їх зв'язок із глікопротеїдами лімфоцитів у хворих на В-хронічний лімфолейкоз, мієлоз та еритремію.

Таким чином, дисертаційна робота Нетроніної Ольги Володимирівни на тему «Сіалові кислоти плазми та сіальованість лімфоцитів при хронічних лімфо- і мієлопроліферативних захворюваннях крові» є практично-орієнтованим та актуальним науковим дослідженням.

2. Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії, медичної та фармацевтичної хімії Дніпропетровської медичної академії згідно плану науково-дослідної роботи кафедри за темою: “Посттрансляційні зміни (модифікації) білків за умов патологічних процесів” (№ держреєстрації 0114U001279).

3. Загальні відомості про роботу. Дисертаційна робота складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 158 сторінках друкованого тексту. Основний текст становить 123 сторінки. Список літератури включає 294 найменування, з яких 129 – латиницею.

4. Характеристика змісту роботи. Вступ відображає актуальність, новизну роботи, зв'язок із темою планового наукового дослідження. Мета і задачі дослідження поставлені чітко. У розділі відображено особистий внесок автора та новизна роботи, її апробація на міжнародних і українських наукових форумах.

Розділ 1. Огляд літератури охоплює достатню кількість сучасних літературних джерел. Цей розділ складається з шести підрозділів. Глибокий аналіз як вітчизняної, так і закордонної літератури дозволив автору правильно обрати напрямки своїх досліджень, що слугувало передумовою для чіткого визначення мети та конкретних завдань дослідження. В ньому доступно, разом із тим достатньо науково, подано характеристику вуглеводних компонентів глікопротеїнів, їх структури та функції, звернуто увагу на особливості біохімії гліколізування глікопротеїнів, наведено інформацію щодо ролі сіалових кислот в організмі людини, обґрунтовано доцільність застосування лектинів як засобу вивчення будови та функції глікопротеїнів, дано біохімічну характеристику ферменту нейрамінідаза, вказано особливості його структури та функції, а також наведено коротку клінічну характеристику хронічних лімфолейкозів та принципи їх фармакотерапії. Розділ завершується загальним висновком, з якого логічно випливає необхідність проведених досліджень.

Розділ "Матеріали і методи досліджень" є досить змістовним, містить дизайн дослідження, методологію виділення лімфоцитів крові, методики визначення загального білку, сіалових кислот як загальних так і вільних, олігозв'язаних і протеїнзв'язаних. Окрім того, в роботі використано такі

сучасні методи дослідження як проточна цитометрія, конфокальна мікроскопія, лектин блок-аналіз, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.

Наступні три розділи власних досліджень написані ретельно і детально, завершуються чіткими і змістовними проміжними висновками щодо отриманих результатів, у заключних частинах розділів наведені посилання на власні публікації в яких оприлюднено результати, представлені в розділах.

В 3 розділі «Визначення сіалових кислот при гематоонкологічних захворюваннях», який складається з 4 підрозділів наведено результати щодо концентрації загальних сіалових кислот за умов хронічних мієло- та лімфолейкозів і на різних етапах лікування пацієнтів із хронічним лімфолейкозом.

Розділ 4 «Визначення активності нейрамінідази» автор наводить результати вивчення змін активності даного ферменту як при досліджуваних гемобластозах (хронічний лімфолейкоз, еритремія, сублейкемічний мієлоз), так і на різних етапах лікування В-хронічного лімфолейкозу.

У розділі 5 «Визначення сіалованості клітин крові» представлені результати дослідження щодо розподілу клітин крові в нормі та при досліджуваних гемобластозах; встановлено щільність експонування сіалотопів $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ МAA1 на лімфоцитах крові хворих на В-хронічний лімфолейкоз; вивчено перерозподіл сіалопозитивних лейкоцитів периферичної крові хворих на хронічний лімфолейкоз на різних етапах хіміотерапії.

Розділ „Аналіз і узагальнення результатів досліджень” написаний на достатньо високому науковому рівні. У розділі детально та всебічно проаналізовані отримані результати з використанням сучасних літературних даних і власних даних. З аналізу результатів випливають чіткі та обґрунтовані узагальнення, які лягли в основу сформульованих висновків дисертації.

Висновки роботи в кількості 6 є об'єктивними та впливають з отриманих даних.

5. Новизна досліджень і одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження різних форм сіалових кислот в плазмі крові хворих на

В-хронічний лімфолейкоз на різних етапах його лікування. Проведено комплексне дослідження з використанням сучасних методів біохімії, мікроскопії, ПЛР та визначення сіальованості глікопротеїнів плазматичних мембран лімфоцитів при В-хронічному лімфолейкозі. Отриманні дані дозволять активізувати пошук біомаркера канцерогенезу та оцінки ефективності хіміотерапії при гематобластозах.

6. Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених досліджень розкривають нові ланки патогенезу В-хронічного лімфолейкозу. Отримані у роботі дані щодо кількісних та якісних змін поверхневих глікокон'югатів лімфоцитів при даній патології є важливим для не тільки для з'ясування механізмів розвитку онкологічних процесів, а й для проведення діагностики та оцінки ефективності фармакотерапії хворих на хронічні лімфо- та мієлопроліферативні захворювання крові, а саме на хронічний лімфолейкоз, хронічний ідіопатичний мієлофіброз та первинну поліцетимію. Закономірності зміни вуглеводного компонента глікокон'югатів плазматичних мембран лімфоцитів можуть служити основою для оцінки якості фармакотерапії хворих на лімфо- та мієлопроліферативні захворювання крові.

Результати роботи впроваджені в науково-навчальний процес кафедри біохімії, медичної та фармацевтичної хімії Державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри біохімії та біофізики Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара при викладанні курсу «Біохімія патологічних процесів», кафедри медичної біохімії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України, кафедри онкології і медичної радіології ДЗ «ДМА МОЗ України», кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України.

7. Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, що сформульовані в дисертації

Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій не викликає сумнівів і визначається використанням у дисертаційній роботі якісно та кількісно репрезентативної вибірки досліджуваного матеріалу. Робота виконана на сучасному методичному рівні. Встановлені мета та завдання дисертаційної роботи дозволяють повністю розкрити проблему дослідження. Методи, методики, застосовані в роботі є сучасними, адекватними, апробованими, відповідають меті та завданням. Цифрові дані опрацьовані методом варіаційної статистики, що дозволяє вважати отримані дані достовірними. Результати дослідження викладені в дисертаційній роботі логічно та послідовно.

8. Особистий внесок здобувача. Автором самостійно розроблено дослідницьку програму, проаналізовано літературу за темою дисертації, проведено експериментальні дослідження, статистичну обробку матеріалу, написано та оформлено роботу. Формулювання завдань і висновків здійснено разом із науковим керівником. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, автору належить аналіз літератури, фактичний матеріал даних експериментальних досліджень, їх статистичної обробки та підготовки матеріалу до друку.

9. Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на VII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2011), X Міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців Шевченківська весна (Київ, 2012), VII Львівсько-Люблінській конференції «Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії (Львів, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології (Дніпропетровськ, 2013), другій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2013), XI

українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), XI міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2015), третій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015).

10. Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, у тому числі 4 статті у фахових наукових часописах, 2 в міжнародних періодичних виданнях; отримано 1 деклараційний патент на винахід; 8 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових форумів.

Автореферат цілком відповідає змісту дисертаційної роботи, написаний українською мовою, повністю відображає зміст і головні результати роботи та за своєю структурою відповідає вимогам ДАК України.

11. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення, матеріали для наукової дискусії.

Недоліки та зауваження щодо оформлення та змісту дисертаційної роботи:

1. В розділі 2 недостатньо чітко визначені критерії включення та виключення для участі пацієнтів в даному дослідженні, а саме не має обґрунтованого розподілу по віку, не зазначені та не враховані супутні захворювання, наявність шкідливих звичок, особливо куріння, адже відомо що ці фактори можуть впливати на рівень сіалових кислот. «Гематологічно здорові донори», які використовувалися як група контролю – це, на мою думку, недостатній рівнем обстеження, адже як уже зазначено вище на концентрацію сіалових кислот і сіальованість лімфоцитів впливає цілий ряд факторів та патологічних станів.
2. Доцільним, окрім того, було би дослідити наявність кореляційних зв'язків між активністю нейрамідази та вмістом сіалових кислот, як вільних так і зв'язаних, сіальованістю лімфоцитів. Для підтвердження своїх результатів авторуслід було би провести багатофакторний регресійний аналіз отриманих результатів, щоб

показало наявність взаємозв'язків між отриманими результатами лабораторних досліджень, фазою протікання хвороби та схемами фармакотерапії.

3. Більш коректним було б точне наведення в таблицях значення p , щоб вказувало на ступінь достовірності, а не лише вказувати *, при $p < 0,05$. Значна кількість даних наведено у вигляді рисунків (наприклад рис. 3.1; 3.2; 3,3; 5,4; та ін.) з яких неможливо точно встановити показник, його відхилення та ступінь достовірності отриманих результатів.

4. У загальних висновках роботи автор не зазначає отриманих у 3 розділі важливих, на мою думку, результатів, що електрофорез білків плазми крові з використанням сіалоспецифічного лектину Бузини чорної (SNA), у групі хворих на В-хронічним лімфолейкозом показав появу білків з молекулярною масою 43-45, 50, та 70кДа та появу білка з молекулярною масою 80кДа, що відповідає глікопротеїну трансферину.

5. В роботі зустрічаються невдалі стилістичні вирази, русизми та граматичні помилки.

Вказані зауваження не є принциповими щодо суті роботи, вони ні в якому разі не зменшують цінності дисертаційної роботи, її наукового, практичного та теоретичного значення. Основні наукові положення та висновки автора не підлягають сумніву.

У плані дискусії хотілось би почути думку дисертанта щодо таких запитань:

1. Яке практичне значення має те, що при В-хронічному лімфолейкозі Ви спостерігали збільшення кількості лімфоцитів крові, які містять на своїй поверхні N-глікани з термінальними $\alpha 2,3$ - та $\alpha 2,6$ -сіаловими кислотами? Кількість SNA-позитивних лімфоцитів при цьому була підвищеною на всіх етапах проведення лікування, а кількість клітин, які зв'язують лектин МААІІ, зменшувалася на всіх етапах лікування.

2. Яку нейрамідазу Ви визначали як «плазмову», і яку, стосовно вивчення сіалованості лімфоцитів, доцільно би було визначати: цитозольну, лізосомальну чи мембранну, адже відомо про їх різні функції?

3. За рахунок якого механізму доксорубіцин, що входить у склад СНОР терапії, зумовлює збільшення концентрації загальних сіалових кислот, на відміну від СОР терапії?

12. Відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Нетроніної Ольги Володимирівни на тему «Сіалованість глікокон'югатів та рівень сіалових кислот при в-хронічному лімфолейкозі», є кваліфікаційною науковою працею, в якій містяться нові науково обгрунтовані результати проведених наукових досліджень, котрі розв'язують конкретне наукове завдання, що має істотне значення для сучасної біохімії та медицини, що знайшло своє відображення у встановлення особливостей обміну сіалококон'югатів плазми та лімфоцитів крові при хронічних лімфо- і мієлопроліферативних захворюваннях.

За актуальністю, методичним рівнем, обсягом виконаних досліджень, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням, ступенем обгрунтованості та достовірністю положень, висновків і рекомендацій дисертаційна робота Нетроніної Ольги Володимирівни на тему «Сіалові кислоти плазми та сіалованість лімфоцитів при хронічних лімфо- і мієлопроліферативних захворюваннях крові» повністю відповідає вимогам п. 11 "Порядку присудження наукових ступенів", які ставляться до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Завідувач кафедри фармакології
з клінічною фармакологією
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний
університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України»
доктор медичних наук, професор

завіряю

Помічник ректора з кадрових питань
Тернопільського медуніверситету

*Відгук надіслано у спеціалізовану
вчену раду № 58. 601. 04 15.06. 2016р
Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради № 58. 601. 04.
доц. Олешко Т.А*

Олешко О.М.