

ВІДГУК

на дисертацію Яровенко Людмили Олександрівни «**Вікові особливості ушкодження та регенерації печінки у щурів при хронічній алкогольній інтоксикації, шляхи корекції виявлених порушень**» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Дисертаційна робота Яровенко Людмили Олександрівни виконана згідно планів та тематик науково-дослідних робіт кафедри патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова згідно теми: «Вікові особливості патогенезу гострої і хронічної патології внутрішніх органів. Патогенетичні підходи до лікування».

Актуальність теми.

Представлена до захисту робота Яровенко Л.О. присвячена дослідженню біохімічних і молекулярних особливостей вікових змін у печінці щурів за її ураження етанолом та за корекції.

Згідно офіційної статистики з кожним роком у світі збільшується кількість населення, які вживають алкогольні напої та є залежними від нього, зокрема для України ця цифра сягає 900 тисяч осіб, серед яких багато молодих дівчат та жінок. Серед органів організму, які найбільш потерпають від дії алкоголю, особливо при його надмірному вживанні, є печінка, в якій відбувається детоксикація ксенобіотиків. При хронічному вживанні алкоголю, особливо довготривалому, розвивається стеатогепатит, фіброз і навіть цироз печінки. Більше того, інші органи, зокрема серце, підшлункова залоза тощо, а також системи організму, зокрема нервова система, зазнають суттєвих змін, що супроводжується розвитком соматичних та психічних захворювань. При хронічній алкогольній інтоксикації не тільки центральна нервова система, що проявляється розумовими дисфункціями, змінами настрою та поведінки, але і периферична нервова система зазнають суттєвих порушень. Досить часто на тлі хронічного алкоголізму неконтрольовано вживають різні лікарські препарати, що призводить до ще більшого навантаження на печінку. Все це становить серйозну медико-соціальну проблему, вирішення якої є надзвичайно актуальним та потребує нових науково-обґрунтованих підходів. Тому проведення досліджень, які сприятимуть з'ясуванню особливостей дії етилового спирту у тварин в залежності від їх віку є виправданим.

Важливо наголосити на тому, що актуальність досліджень, які проводяться на молекулярному рівні, зокрема при з'ясуванні функціонального стану молекул ДНК, полягає у тому, що вони сприятимуть виявленню конкретних мішеней, що , в свою чергу, дозволить запобігати

виникненню та усуненню патологічних змін індукованих дією етанолу шляхом застосування коригуючих засобів.

На даний час не існує чіткої думки щодо особливостей впливу етанолу на тканини печінку в залежності від віку тварин. Дані літературних джерел свідчать про те, що сучасні методичні підходи сконцентровані на запобіганні розвитку та перебігу гепатотоксичності переважно шляхом усунення проявів та наслідків дії етанолу, без розуміння конкретних мішеней, а також механізмів залучених до реалізації його руйнівного впливу. Тому вирішення поставлених в дисертаційній роботі завдань є актуальним як з огляду на необхідність більш глибокого розуміння стану клітин печінки за хронічного вживання алкоголю, так і стану носія генетичної інформації, ДНК гепатоцитів. Адже, досить часто залежність від алкоголю призводить не тільки до втрати працездатності, інвалідності, але, нерідко, і до смертності людей.

В зв'язку з цим, дослідження спрямовані на пошук препаратів, компоненти яких мають природне походження, для корекції структурних, метаболічних та функціональних порушень викликаних надмірним вживанням алкоголю є обґрунтованими та актуальними. Більше того, виявлення високочутливих маркерів ураження гепатоцитів на ранніх стадіях зловживання алкоголем може сприяти розробці ефективних підходів для діагностики та корекції дисфункцій тканини печінки. Вибір автором для регенерації тканини печінки у щурів на тлі хронічної алкогольної інтоксикації кверцетину та глутаргіну, в якості коригуючих засобів, є доцільним.

Обґрунтованість наукових положень дисертації. Їх достовірність і новизна.

Актуальність наукових досліджень згідно вибраної теми добре обґрунтована як в теоретичному, так і в практичному аспекті. На основі сформульованої мети роботи автором поставлена низка конкретних завдань проведення досліджень із використанням сучасних методів. Людмила Олександрівна використала адекватні експериментальні моделі хронічної алкогольної інтоксикації у самок-щурів різного віку. Це дозволило автору провести дослідження щодо з'ясування дії етанолу на тканини печінки та отримати результати, на основі яких обґрунтовані основні наукові положення. Автором на основі отриманих результатів, які є достовірними, сформульовані висновки.

Наукове значення роботи полягає у тому, що автором вперше з'ясовано, що коригуюча дія кверцетину та глутаргіну на тлі дії етанолу тканини печінки щурів різного віку залежить як від віку тварин так і від реалізації дії коригуючих засобів згідно їх природи. Показано, що глутаргін пригнічував розвиток синдромів холестази та цитолізу, а кверцетин інгібував розвиток мезенхімального запалення та сприяв відновленню протеїнсинтезуючої функції печінки у всіх тварин незалежно від віку.

Автором виявлено, що рівень IGF-1 у сироватці крові всіх вікових категорій щурів за хронічного алкогольного ушкодження печінки знижувався. За введення кверцетину статевозрілим тваринам рівень IGF-1 також знижувався, у той час як вплив глутаргіну був зворотнім, призводячи до зростання його вмісту порівняно із контролем відповідного віку, що може свідчити про активацію процесів регенерації тканин печінки.

При дослідженні механізмів ушкодження та регенерації ядер клітин печінки встановлено, що хронічна інтоксикація етанолом може призводити до апоптичної загибелі гепатоцитів, не виключено, що в результаті пригнічення біосинтетичних процесів в ядрах гепатоцитів із переважанням процесів поліплоїдизації у статевонезрілих, статевозрілих та старих самок щурів. При застосуванні кверцетину і глутаргіну виявлено збільшення диплоїдних ядер клітин печінки, що може бути доказом того, що регенерація печінки відбувається шляхом проліферації.

У щурів всіх досліджуваних вікових категорій на тлі хронічної дії етанолу виявлено зміни морфофункціонального стану печінки, зокрема структури паренхіми. Глутаргін проявляв нормалізуючий вплив на морфофункціональний стан печінки, забезпечуючи регенерацію клітин печінки.

Новизною роботи є також те, що встановлено наявність зв'язку між характерними біохімічними показниками функціонального стану печінки та рівнем IGF-1 сироватки крові із фазами клітинного циклу, фрагментацією ДНК, плоїдністю ядер клітин печінки, морфометричними показниками у щурів різного віку на тлі хронічної дії алкоголю та за корекції кверцетином та глутаргіном, що найбільш виражено у статевозрілих щурів. Отримані автором результати свідчать про можливість застосування кверцетину та глутаргіну в якості гепатпротекторних засобів за хронічного впливу алкоголю.

Важливим аспектом представленої до захисту роботи є те, що Яровенко Л.О. отримала нові експериментальні дані, які продемонстрували, що хронічна алкогольна інтоксикація призводить до суттєвих порушень досліджуваних біохімічних процесів у печінці, органі, який відіграє надзвичайно важливу роль в організмі, яким можна запобігати використовуючи кверцетин та глутаргін.

Науково-практична значимість роботи та конкретні шляхи використання результатів дослідження.

Отримані автором результати проведених досліджень доповнюють та поглиблюють існуючі у науковій літературі дані відносно біохімічних механізмів алкогольного ушкодження печінки щурів-самок різного віку за хронічного впливу етанолу та її регенерації при застосуванні кверцетину та глутаргіну, що може знайти застосування при лікуванні хронічного алкоголізму. Запропоновано спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при алкогольних ушкодженнях печінки (Патент

№ 99811 від 25.06.2015 р., Україна). Основні результати досліджень впроваджено у науково-навчальний процес кафедр біологічної та загальної хімії, патофізіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, кафедри медичної хімії Одеського національного медичного університету, кафедри медичної біохімії ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”, кафедри біологічної та медичної хімії імені академіка Г.О. Бабенка ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет.

Структура роботи.

Автором самостійно проведено патентний пошук, опановано нові методи, виконано практично всю основну частину досліджень та опрацьовано наукову літературу із досліджуваної проблеми у вітчизняних та зарубіжних виданнях (252 посилання). Аналіз одержаних результатів здійснено за консультативної допомоги наукового керівника. Всі первинні результати теоретично обґрунтовано, статистично опрацьовано та сформульовано висновки. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 4-х розділів результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних літературних джерел. Робота викладена на 158 сторінках друкованого тексту та ілюстрована 6 таблицями і 27 рисунками та містить 8 додатків. Яровенко Л.О. приймала участь у підготовці наукових статей та має дві одноосібні статті.

У вступі представленої до захисту роботи автором чітко сформульовані положення щодо актуальності обраної теми, зв'язку роботи з науковими програмами, плановими темами, мета і завдання досліджень, наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення, особистий внесок здобувача, апробація результатів роботи, а також публікації за темою дисертації.

Огляд літератури у повній мірі висвітлює сучасний стан досліджуваної автором проблеми. У ньому також акцентована увага на відомих механізмах дії алкоголю на організм людини в залежності від термінів його вживання. Розглянуто стан печінки за токсичного ураження етанолом а також сучасні методичні підходи для корекції метаболічних та функціональних порушень, викликаних його дією. Огляд літератури відповідає темі та меті, а також робить виправданим розгляд поставлених у дисертаційній роботі завдань.

У роботі у повній мірі викладена інформація стосовно об'єкту, предмету, матеріалів та методів досліджень.

У розділі 2 (таблиця 2.1) представлено розподіл тварин по вікових групах та вказана їх кількість. У роботі автором використано біохімічні, імуноферментні, цитофлуориметричні, морфологічні та методи математичної статистики. Для аналізу деяких біохімічних показників були використані стандартні тест-набори.

Загалом, експериментальна робота Яровенко Л.О за обсягом отриманих результатів, їх новизною як у науковому, так і в практичному аспекті відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій. На основі аналізу та узагальнення отриманих результатів автором сформульовані висновки, які цілком відповідають меті та змісту роботи, а їх достовірність підтверджується застосуванням методу статистичного аналізу.

Основні положення дисертаційної роботи Яровенко Людмили Олександрівни викладені в авторефераті та 19 наукових працях, з них 10 статей, з яких 4 у наукових фахових виданнях України (2 – одноосібних), 1 – у закордонному виданні та 8 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конгресів, конференцій та з'їздів, а також 1 деклараційний патент України на корисну модель. Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

Однак, незважаючи на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи в контексті дискусії до роботи Яровенко Л.О. є зауваження, запитання та побажання.

Слід було для визначення вмісту білка використати загальноприйняті у біохімічній практиці методи, зокрема метод Бредфорда або Лоурі.

Чим обумовлено використання гормонально-залежних самок щурів для характеристики вікових змін за дії алкоголю?

Автор для досліджень використовувала «шматочки, фрагменти» печінки, однак печінка не є однорідною тканиною, тому який підхід був до їх вибору та наскільки отримані дані можуть характеризувати цілий орган?

Чим можна пояснити, що тимолова проба у статевонезрілих і статевозрілих контрольних щурів однакова і не залежить від їх віку?

Чому для досліджень в якості коригуючого засобу вибрано глутаргін, адже до його складу входить глутамат, який може призводити до нейротоксичності, яка і так розвивається при хронічному вживанні алкоголю, а L-аргінін може призводити до надмірного утворення оксиду азоту, а отже і до пероксинітриту, одного із найнебезпечніших активних форм кисню?

Бажано було провести дослідження по з'ясуванню дії L-аргініну і глутамату окремо, а потім вже використовувати комерційний препарат, склад і тип зв'язку в якому цих амінокислот не зрозумілий, це що їх конюгат, чи є ще якісь компоненти?

В огляді літератури автору слід було б також навести сучасні відомості щодо важливої ролі центральної нервової системи у розвитку хронічної алкогольної залежності, оскільки відомо, що надмірне вживання алкоголю сильно гальмує провідність нервових імпульсів тим самим знижуючи поріг чутливості мозку до стресу.

Відомо, що рівень алкогольдегідрогенази, ензиму що приймає участь в обміні етанолу, у жінок нижче, ніж у чоловіків, тому і небезпечна доза алкоголю для жінок приблизно в два рази нижча, ніж для чоловіків, то наскільки це враховувалося при моделюванні алкогольної залежності?

Наскільки терміни вживання етанолу адекватно відповідають створеним експериментальним моделям?

У розділі 2 при описі деяких методів визначення біохімічних показників слід було більший акцент робити на принципі методу.

Базуючись на отриманих даних, яка думка автора щодо механізмів коригуючої дії кверцетину та глутаргіну, тобто чи є синергізм дії кожної складової, що входить до їх складу, чи кожний компонент діє окремо і на лише певні метаболічні шляхи?

Бажано було б автору визначити активність алкогольдегідрогенази у печінці шурів всіх вікових груп, що доповнило б розуміння механізмів дії алкоголю та застосованих коригуючих засобів.

Не зовсім зрозумілим є опис моделювання хронічної алкогольної інтоксикації у шурів-самок в авторефераті, с.5. У роботі також зустрічаються деякі невдалі з наукової точки зору вислови (...проводили через батарею спиртів...).

На основі отриманих даних, бажано знати думку автора, яким же шляхом відбувається загибель гепатоцитів та що є доказом.

Наведені зауваження, на мій погляд, принципово не впливають на загальну позитивну оцінку представленої до захисту роботи. Дисертаційна робота Яровенко Людмили Олександрівни «Вікові особливості ушкодження та регенерації печінки у шурів при хронічній алкогольній інтоксикації, шляхи корекції виявлених порушень», в якій представлені нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують поставлені в роботі завдання, є завершеною працею.

Висновок.

За актуальністю, вирішенням поставлених завдань з використанням сучасних методів та експериментальних підходів, теоретичною та практичною значимістю дана робота відповідає вимогам п. 9, 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор, Яровенко Людмила Олександрівна, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Офіційний опонент:
Провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів
Інституту біохімії
ім. О. В. Палладіна НАН України
доктор біологічних наук

Т.М. Кучмєрєвська

Т.М. Кучмєрєвська



*Відсек магістерів в спеціалізованій вченій раді
к 58.601.04. 15.06.2016 року
Вчений секретар спеціалізованої вченої ради
к 58.601.04*

Григор'єв доц. Яришечко Г.Я.