

ВІДГУК

офіційного опонента,

кандидата біологічних наук, доцента, доцента кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка

Бродяк Ірини Володимирівни

на дисертаційну роботу Ліпкан Наїри Георгіївни

“Імуно-біохімічні фактори формування оксидативного стресу при хронічній серцевій недостатності”,

подану на здобуття ступеня доктора філософії

за спеціальністю 091 – Біологія

1. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Вивчення патогенезу та дослідження ефективних способів лікування хронічної серцевої недостатності як біологами, так і лікарями продовж останніх десятиріч вказують про те, що це захворювання залишається одним з найважчих і прогностично несприятливим серед серцево-судинних патологій.

В патогенезі хронічної серцевої недостатності важливу роль відіграє оксидативний стрес, за якого виникає дисбаланс між активністю про- та антиоксидантних систем. Надмірне утворення активних форм кисню й інших вільнорадикальних сполук з одночасним зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту провокує значні зміни у структурі та функціональній активності ключових внутрішньо- та позаклітинних біоорганічних молекул. Усі ці зміни на рівні біомолекул безумовно обумовлюють розвиток метаболічних розладів на рівні цілого організму, зокрема порушують функціональний стан імунокомпетентних клітин крові. Тому виконана дисертаційна робота, в якій досліджувалися імуно-біохімічні фактори формування оксидативного стресу за хронічної серцевої недостатності, є актуальною науковою працею.

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

Дисертаційне дослідження виконане згідно плану науково-дослідної роботи кафедри біології Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя за темами: “Дослідження біохімічних механізмів біологічної активності фізіологічно-активних речовин. Біохімічні механізми розвитку патологічних станів та дії біологічно активних речовин за цих умов” упродовж 2019–2022 років (реєстраційний номер 0119U100157) та “Стан функціональних систем в умовах формування адаптаційних реакцій та ефектів біологічно активних сполук за цих

умов” (реєстраційний номер 0123U100614, термін виконання 2023–2027 рр.). Дисертант був співвиконавцем вказаних тем.

3. Наукова новизна одержаних результатів.

В дисертаційній роботі досліджено та проаналізовано роль мононуклеарних клітин периферичної крові у розвитку запального процесу й оксидативного стресу, а також їхній вплив на основне захворювання та його прогресування із розвитком тяжких ускладнень, які загрожують життю.

Досліджено як прогресує ця серцево-судинна патологія на фоні інтенсифікованого оксидативного стресу. Як вважає дисертант, важливою зв'язувальною ланкою є достовірна зміна вмісту цитруліну як одного із продуктів реакції, яку каталізує індукцибельна ізоформа NO-синтази (iNOS) мононуклеарних клітин крові. Автор у роботі вказує на можливість використання рівня цитруліну в мононуклеарних клітинах крові як показника, що може характеризувати активність iNOS.

Виявлено однонаправленість змін вмісту цитруліну у мононуклеарних клітинах крові та сироватці крові у здорових осіб і у пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю. Проте у самій роботі дисертантка не пояснює, на що вказує ця однонаправленість і якими біологічними змінами в організмі можна це пояснити.

Вперше продемонстровано можливість використання рівня цитруліну в мононуклеарних клітинах крові та сироватці крові як маркера наявності імунної активації та оксидативного стресу, які зумовлюють прогресування основного серцево-судинного захворювання та хронічної серцевої недостатності, а також розвиток різних коморбідних станів, зокрема порушення функціонування нирок. Варто зазначити, що у роботі не було проведено досліджень, які дали б змогу робити висновки про порушення функціональної активності проксимальних каналців нирок.

4. Наукове та практичне значення.

Отримані результати мають практичне значення, оскільки розширюють теоретичну базу для обґрунтування використання в клінічній лабораторній діагностиці серцево-судинних захворювань, зокрема хронічної серцевої недостатності, показника вмісту цитруліну в сироватці крові.

Отримані результати впроваджені в навчальний процес під час викладання дисциплін “Системна фізіологія”, “Фізіологія людини і тварин”, “Основи патофізіологія” фахової підготовки здобувачів освітніх ступенів Бакалавр, Магістр

і Доктор філософії за галуззю знань 09 Біологія, що підтверджено відповідною довідкою про впровадження (див. Додаток до дисертаційної роботи, с. 148).

5. Повнота викладення матеріалу дисертації у наукових публікаціях.

Результати дисертаційного дослідження були висвітлені в 11 наукових працях. За матеріалами дисертації опубліковано 4 статті у фахових наукових виданнях, рекомендованих переліком МОН України (біологічні науки, кат. Б), а також 7 тез доповідей на міжнародних і всеукраїнських конференціях і конгресах.

6. Ступінь обґрунтованості наукових положень.

Наукові положення та три із чотирьох висновків, сформульовані в дисертації, ґрунтуються на значній кількості фактичного матеріалу. Вважаю, що висновок під номером три не відповідає отриманим результатам, які представлено й обговорено у дисертаційній роботі, а також тому завданню, яке сформульовано у вступі до дисертаційної роботи.

Для досягнення мети та вирішення поставлених завдань було застосовано відповідні методи досліджень. Достовірність виявлених закономірностей підтверджена статистичною обробкою.

7. Структура та зміст дисертації, її завершеність та відповідність встановленим вимогам.

Дисертацію викладено на 148 сторінках українською мовою, основна частина становить 96 сторінок, містить 33 таблиці.

Дисертаційна робота розпочинається з анотації та ключових слів, які написані державною та англійською мовами, списку публікацій здобувача за темою дисертації, переліку умовних скорочень і змісту роботи.

Робота містить такі розділи: “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали та методи досліджень”, три розділи “Результати досліджень”, “Узагальнення”, “Висновки”, а також список літературних джерел до кожного з розділів, додаток.

У вступі (с. 20–25) обґрунтовано актуальність теми дисертаційного дослідження, відображено зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, сформульовано мету, завдання, вказані методи дослідження. Відображено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів дослідження. Наведено інформацію про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дослідження, публікації, структуру й обсяг дисертації.

Варто зазначити, що з 15 літературних джерел, які використано для написання “Вступу” до дисертації, лише три з них за останні 5 років (2021, 2019, 2019). Саме цей розділ потребує найглибшого аналізу літературних даних для

висвітлення актуальності досліджуваної проблеми. На жаль, автором не здійснено цього.

Огляд літератури (розділ 1, с. 28–49) стосується аналізу наявних даних за темою дисертаційного дослідження. У цьому розділі дисертантка констатує, що “За останніми даними, на ХСН страждають 1,5–2,0 % всього населення земної кулі”, при цьому робить посилання на літературне джерело, опубліковане російською мовою у 2002 р. (*Малая Л.Т., Горб Ю.Г. Хроническая сердечная недостаточность: достижения, проблемы, перспективы. Х.: Торсинг, 2002. 768 с.*), а також, що “В Україні розповсюдженість ХСН серед мешканців у віці 20-69 років складає 1,7 %” і цитує два літературні джерела за 2003 і 2008 р.

Другий розділ (с. 63–72) містить дані про організацію дослідження та методики, використанні під час експериментів.

У третьому, четвертому, п'ятому розділах (с. 75–90, 93–116, 121–133, відповідно) авторка подає власні результати досліджень, які характеризують імунозапальні процеси на фоні хронічної серцевої недостатності, інтенсивність оксидативного стресу, вміст цитруліну на фоні досліджуваної патології, структурно-функціональні зміни серця та показники центральної гемодинаміки у людей, що страждають на хронічну серцеву недостатність.

В останньому розділі 6 (с. 137–142) дисертантка робить узагальнення отриманих результатів, проте часто без жодних посилань на літературні джерела. Лише одинадцять джерел використано для написання цього розділу. Варто зазначити, що аналіз отриманих даних розкриває певні додаткові особливості оксидативного стресу й імунозапальної активації, проте ґрунтовно не пояснює патофізіологічних механізмів прогресування хронічної серцевої недостатності.

На основі проведених досліджень дисертантка формулює 4 висновки (с. 145–147), які відображають результати роботи.

Рукопис містить список цитованої літератури до кожного з розділів, до якого входять 211 найменувань.

За результатами перевірки у програмі “StrikePlagiarism.com” матеріал дисертаційної роботи є унікальним (коефіцієнт подібності (КП1) становить 6,77%, КП2 – 2,41%), вказуючи на те, що дисертанткою дотримано норм академічної доброчесності.

8. Дискусійні положення та зауваження до дисертації.

Дисертаційна робота Ліпкан Н. Г. за своїм змістом і формою є завершеним самостійним науковим дослідженням. Оцінюючи наукове і практичне значення дисертаційної роботи, висловлюю деякі зауваження, побажання та уточнення:

1. Анотація у дисертаційній роботі – це скорочений варіант “Вступу” з тими ж самими підпунктами. Автором не здійснено глибокого аналізу власної роботи, тому анотація в структурі дисертації втратила свою цінність. Окрім того, як приклад наводжу речення з анотації “У ряді досліджень продемонстровано, що у патогенезі ХСН важливу роль відіграє оксидативний стрес, ... (с. 2)”, “Вищезазначені патофізіологічні реакції при ХСН досліджувались низкою авторів... (с. 3)”, зміст яких є незрозумілим, адже немає посилання на літературні джерела, щоб підтвердити чи спростувати ті факти, які наводить автор.

2. Робота містить значну кількість аббревіатур, через які її важко читати. Окрім того, деяких немає в списку аббревіатур, наприклад: ФП, АП, NT-pro-BNP.

3. Вступ. Наукова новизна одержаних результатів.

3.1. “На основі проведених досліджень та аналізу отриманих результатів продемонстровано глибокі взаємозв’язки між системною імунозапальною активацією та формуванням оксидативного стресу ...” На основі яких досліджених показників автор може стверджувати чи зміни є глибокі, чи ні? Вважаю, що цей термін в контексті роботи взагалі є недоречним.

3.2. “Зростання рівня цитруліну в сироватці крові може свідчити також про раннє порушення функціональної активності проксимальних каналців нирок.” Чи є в цьому реченні новизна, якщо автор зазначає, що “може свідчити”.

3.3. “...імуноне запалення може як ініціювати формування оксидативного стресу, так і сприяти інтенсифікації вже існуючого на фоні ...”. Якщо це новизна роботи, то має бути чітко описано, за змін яких біомаркерних показників можна стверджувати про ініціювання, а за яких – про інтенсифікацію формування оксидативного стресу.

Розділ 1.

4. Некоректні, ненаукові терміни: “NO-синтази поділяються на конституційні” (згідно твердження автора ензими є конституційні, а інші тоді які? без конституції?!); “Дослідники виявили здібність ізольованої артерії до...” (Чи можуть артерії мати якість здібності?); “с наступною”; “радікалі”; “хлорноватиста кислота”; “матричних металопротеїназ”.

5. Некоректне за формулюванням речення: “Останні здатні окислювати НАДФ⁺ із утворенням супероксиду кисню”. До якої сполуки можна окиснити НАДФ⁺?

Розділ 2.

6. На с. 63 двічі зазначено різний вік пацієнтів, які було включено у дослідження: на початку сторінки – “149 пацієнтів з ХСН віком від 18 до 75 років (середній вік 55 р.)”, а вже у кінці – “Середній вік пацієнтів складав 55 (48-63) років. Групу

контролю складали 20 практично здорових осіб відповідного віку та статі”. Виникає уточнююче запитання, то якого віку були пацієнти з ХСН та здорові донори?

7. Чому моноклеарні клітини виділяли з плазми, а не з цільної крові? З якою метою “... кров, що вміщує гепарин, залишали стояти при 20 °С впродовж двох годин”?

8. Методики описані незрозуміло і без посилань на відповідні літературні джерела. Наприклад, “Збирали клітини з інтерфазного кільця в пробірку, відмивали їх від залишків фіколу в живильному середовищі, зливали надосадову рідину і додають до клітин 0,3 мл живильного середовища. Далі проводили НСТ-тест на скельцях (*Що це за методика на скельцях?*). Під мікроскопом підраховують кількість формазан-позитивних клітин на 100 клітин”; “... клітини ресуспендували в 1 мл поживного середовища з додаванням 10 % ембріональної сироватки, проводили підрахунок клітин (*Як?*), доводили їх кількість до кінцевої концентрації ...” (*клітини в одиницях концентрації не виражають!*); “Для оцінки активності iNOS в якості показника використовували показник вмісту стабільного метаболіту NO-синтазної реакції – цитруліну в інкубаційному середовищі МНПК [10]” (*методика не описана*).

9. “Вміст продуктів окислення білків визначали спектрофотометрично за методом [6] з модифікацією для гомогенатів тканин”. З якою метою було обрано саме модифікацію для тканин, адже дисертантка працювала із клітинами крові?

Розділ 3.

10. “Вони регулюють взаємозв’язок між імунною, ендокринною, нервовою системами і здатні впливати на реактогенні властивості клітин як позитивного, так і негативного характеру”. Що автор має на увазі під реактогенними властивостями, та які з них є позитивного, а які негативного характеру?

11. Пірогенал для індукованого НСТ-тесту додавали у кількості 10 мкг/мл, а в статті під номером 15 (*Ломаковський О. М., Гавриленко Т. І., Лутай М. І., Підгайна О. А. Зміни функціональної активності імунної системи та ліпідного обміну впродовж тривалого спостереження пацієнтів із ішемічною хворобою серця та стабільною стенокардією. Український ревматологічний журнал. 2013. № 4. С. 61–66.*), на яку автор робить посилання, було використано 1,25 мкг/мл. Незрозуміло, з якою метою здійснювалися такі модифікації методу.

Розділ 4.

12. “аналізуючи отримані результати, інтенсивність оксидативних процесів більш висока у групі пацієнтів-чоловіків з ХСН ... (с. 95)”. Дисертант не пояснює механізм такої відмінності.

13. Некоректні терміни та помилки під час друку: “Зниження активностей антиоксидантного ферментної ланки..”; “лкснення”; “порівняно”; “запалення низької градації в організмі”; “сохранність”; “Ці результати дозволяють дійти до висновку, що оксидативний стрес в залежності від діагнозу і умов в організмі може формуватися за рахунок інтенсифікації вільнорадикальних окиснювальних процесів ліпідів або білків”; “цтруліну”; “недостатності”; “приймають учать”.

14. “... індукована продукція цитруліну у МНПК виявилась зниженою у два і більше разів, що може вказувати на зменшення резервних можливостей функціональної активності імунокомпетентних клітин в умовах ХСН”. Вважаю, що робити висновки про резервні можливості функціональної активності мононуклеарів на основі зміни лише концентрації цитруліну не можна.

15. “Амінокислота цитрулін є однією із важливих регуляторів проміжного обміну речовин в організмі [11, 12]. Ця амінокислота є потужним антиоксидантом, завдяки чому вона з високою ефективністю може захищати різні молекули від окислювальної модифікації [13]”, (с. 113). Чому на фоні зростання вмісту цитруліну в плазмі крові (як стверджує дисертантка, “цитрулін є потужним антиоксидантом”) рівень окисно модифікованих білків і продуктів перекисного окиснення ліпідів зростає?

16. У роботі дуже однобоко висвітлено і обговорено роль мононуклеарних клітин периферичної крові – лише як прозапальні клітини, а на їхній ролі як супресорів чи регуляторів адаптивної імунної відповіді взагалі не було зроблено жодного акценту.

17. На основі зміни вмісту цитруліну (с. 114) дисертант не може стверджувати про зростання активності іNOS. Активність ензимів не визначають за кількістю продукту в середовищі. (“Оцінка активності іNOS за величиною вмісту цитруліну дозволяє більш точно встановити ризк несприятливого перебігу захворювання, ...” с. 115).

18. Вміст цитруліну не зазнавав достовірних змін у межах груп порівняння пацієнтів з ХСН, тому робити висновок про диференціальну діагностику цієї патології на основі зміни вмісту цитруліну автор не може (с. 116).

19. “Під його впливом на клітини ендотелію відбувається зміна електричного потенціалу мембрани ендотеліоциту, стимуляція синтезу ІЛ-6, пригнічення

активності протеїну С, підвищення прокоагулянтної активності тощо”, с. 138. Які літературні джерел це підтверджують? З результатів роботи автор такого висновку зробити не може.

20. Вважаю, що під час формулювання третього висновку слід було взяти до уваги наявну інформацію з літературних джерел (наприклад, *Molecules*, 2023, <https://doi.org/10.3390/molecules28020814>; *Frontiers in Immunology*, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00532) щодо відмінностей метаболічних процесів у субпопуляціях макрофагів, зокрема щодо можливостей утворення цитруліну.

Однак, вищенаведені зауваження істотно не впливають на науково-практичну цінність роботи.

9. Загальний висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота Ліпкан Наїри Георгіївни “Імуно-біохімічні фактори формування оксидативного стресу при хронічній серцевій недостатності” за актуальністю та новизною, об’ємом, аналізом й інтерпретацією результатів проведеного дослідження, а також науково-теоретичним і практичним значенням відповідає вимогам “Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії” (Постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44), а дисертантка – Ліпкан Наїра Георгіївна – з урахуванням виконання в повному обсязі освітньої складової освітньо-наукової програми та індивідуального плану наукової роботи, заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 “Біологія” за спеціальністю 091 “Біологія”.

Офіційний опонент:

кандидат біологічних наук, доцент,
доцент кафедри біохімії
Львівського національного університету
імені Івана Франка

Ірина БРОДЯК

Підпис доц. Ірини БРОДЯК підтверджую.

Вчений секретар Львівського національного
університету імені Івана Франка, доцент

Ольга ГРАБОВЕЦЬКА