

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, завідувача
кафедри анатомії з клінічною анатомією та оперативною хірургією

Полтавського державного медичного університету

БІЛАША СЕРГІЯ МИХАЙЛОВИЧА

на дисертацію аспірантки кафедри гістології ВНМУ ім. М. І. Пирогова

ГРИЦЕНКО АНТОНІНИ СЕРГІЇВНИ

на тему: «Морфологічні зміни селезінки щурів за умов гіпергомоцистеїнемії
залежно від віку», подану до захисту у разову спеціалізовану вчену раду ДФ
05.600.141 з правом прийняття до розгляду та проведення разового захисту
дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 Охорона
здоров'я за спеціальністю 222 Медицина

1. Ступінь актуальності обраної теми.

Актуальність дослідження структурних перебудов селезінки за умов
хронічного впливу гіпергомоцистеїнемії, є незаперечною. З мета даних
відомо, гіпергомоцистеїнемія – це стан, що характеризується підвищеним
рівнем гомоцистеїну в крові і визнається окремим захворюванням, в
основному через дисфункцію ферментів і кофакторів метаболізму
гомоцистеїну. Ця патологія може бути спровокована генетичними мутаціями
генів, що каталізують реакції метаболізму гомоцистеїну, дефіцитом
вітамінних кофакторів у харчуванні, шкідливими звичками, певними
медикаментами або низкою захворювань внутрішніх органів. Причинами
дефіцитних станів виступають захворювання травної трубки, що
супроводжуються зниженням всмоктування вітамінів. Відомо також, що
онкологічні захворювання, такі як рак молочної та підшлункової залоз,
яєчників, лімфобластний лейкоз супроводжуються станом
гіпергомоцистеїнемії, оскільки злоякісні клітини відрізняються високою
мітотичною активністю, потребуючи значної кількості метильних груп.
Зазначені вище фактори належать до модифікуючих та зумовлюють

тимчасову гіпергомоцистеїнемію.

Вивченню патогенного впливу підвищеного рівня гомоцистеїну в плазмі крові присвячена низка робіт, однак і до сьогодні це питання залишається не повністю розкритим. Серед основних механізмів негативної дії хронічної гіпергомоцистеїнемії слід зазначити активацію оксидативного стресу та стресу ендоплазматичної сітки, порушення експресії генів, стимуляцію медіаторів запалення та фіброзу, гальмування процесів метилування, гомоцистеїнування білків. Гіпергомоцистеїнемія також пов'язана зі старінням: незалежні дослідницькі групи виявили, що рівень гомоцистеїну в крові статистично підвищується кожні 10 років після 60 років.

Не дивлячись на чисельні дослідження та значні досягнення сучасної науки у вивченні ролі гомоцистеїну в патогенезі багатьох захворювань внутрішніх органів, на сьогоднішній день відкритим залишається питання щодо змін структури селезінки на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях. Роботи, що існують розкривають лише певні функціональні зміни органу, не демонструючи при цьому особливостей її морфологічного ураження.

Таким чином, дисертаційна робота Гриценко Антоніни Сергіївни на тему: «Морфологічні зміни селезінки щурів за умов гіпергомоцистеїнемії залежно від віку» є своєчасною та актуальною для медицини.

2. Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача.

Дисертаційна робота Гриценко Антоніни Сергіївни виконана на високому науковому рівні. Здобувачкою доведена актуальність обраної теми досліджень, здійснено ґрунтовний розгляд та аналіз даних вітчизняних та закордонних дослідників у напрямку тематики дисертаційної роботи. Проведена достатня кількість спостережень та отримані результати, які дозволили визначити зміни структури селезінки щурів різного віку, що поглиблюються на тлі хронічної гіпергомоцистеїнемії. Основні положення та висновки дисертації належним

чином обґрунтовані, апробовані на вагомих фахових наукових форумах та чітко відповідають отриманим результатам.

Усі наукові праці за результатами дисертаційного дослідження (загальна кількість яких 8, з них 5 – одноосібні) відповідають існуючим вимогам до публікацій на здобуття ступеня доктора філософії, пройшли відповідну експертну оцінку та опубліковані у фахових наукових виданнях належного рівня: 5 статей – в наукових фахових журналах України (2 з яких відноситься до міжнародної наукометричної бази Scopus, а 1 – до бази Web of Science) та 3 тез в матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій.

3. Новизна представлених теоретичних та/або експериментальних результатів проведених здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях.

Новизна отриманих результатів дослідження не викликає сумніву. Дисертанткою вперше встановлені гістологічні, ультрамікроскопічні та біохімічні зміни селезінки різних за віком щурів та за умов гіпергомоцистемії. Встановлено, що в селезінці молодих щурів спостерігались зміни з боку як Т-клітинних периартеріальних піхв, так і В-клітинних вузликів, які проявлялися проліферацією В-клітин на фоні зниження концентрації Т-клітин, інфільтрацією Т - і В-клітин у червону пульпу, розширенням маргінальних зон. У зрілих тварин виявлялись більш виражені структурні зміни в органі в порівнянні з молодими тваринами, які характеризувалися зміною щільності та організованості волокон сполучнотканинної капсули та трабекул органу, вакуолізацією субкапсулярної зони селезінкової пульпи, проліферацією В-клітин, наявністю в червоній пульпі макрофагів з включеннями ліпофусцину. Найбільш виражені зміни були у старих щурів: дезорганізація строми органу, загибель Т-клітин шляхом апоптозу з появою просвітів у периартеріальних піхвах, підвищена проліферація В-клітин, інфільтрація плазмочитів у червону пульпу, зростання кількості включень ліпофусцину в макрофагах селезінки; осередки загибелі Т-

клітин були більшими, ніж у тварин інших експериментальних груп. Структурні зміни виявлялись також в мікроциркуляторному руслі селезінки.

Також уперше на ультраструктурному рівні встановлено, що при експериментальній гіпергомоцистемії у селезінці молодих щурів відмічались розширення синусоїдних капілярів із значною кількістю еритроцитів, зниження кількості зрілих Т-лімфоцитів та підвищення кількості В-лімфоцитів, плазмоцитів, лімфобластів та макрофагів; виявлені чисельні лімфобласти з ознаками деструкції та пікнозом ядер; в червоній пульпі – макрофаги з вакуолями, гранулами ліпофусцину та гемосидерину. У тварин зрілого віку ультраструктурні зміни селезінки характеризувалися розширенням синусоїдних капілярів, скупченням в них еритроцитів та тромбоцитів на стадії деструкції, значною загибеллю Т-лімфоцитів білої пульпи шляхом апоптозу, проліферацією В-лімфоцитів, переважанням зрілих плазмоцитів, наявністю в червоній пульпі макрофагів з великою кількістю детриту, фрагментами фагоцитованого матеріалу та включеннями ліпофусцину. В стромі селезінки старих щурів були наявні ретикулярні клітини з гіперхромними ядрами та перинуклеарним набряком. В білій пульпі відмічались ділянки загибелі Т-лімфоцитів, підвищена кількість плазмоцитів внаслідок проліферації В-лімфоцитів. В червоній пульпі – чисельні фрагменти гемолізованих еритроцитів та тромбоцитів, макрофаги з залишками деструктивно змінених формених елементів крові, скупченнями гемосидерину та гранулами ліпофусцину.

Вперше при біохімічному дослідженні зразків крові та гомогенатів селезінки щурів різного віку на тлі гіпергомоцистемії встановлено зростання загальної протеолітичної активності, що було обумовлено активацією серинових протеаз, металозалежних ферментів, цистеїнових та аспарагінових протеаз. Також було відмічено порушення балансу між ММП-1 та ТІМП-1, що додатково посилювало активність металозалежних ферментів.

Слід зазначити, що в опублікованих працях дисертанткою у повному обсязі представлені усі отримані результати досліджень.

4. Наукова обґрунтованість та відповідність темі дисертації отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертація виконана із залученням достатньої кількості тварин – 64 білих безпородних щурах-самцях (перманентна вага – 61-335 г), що отримані з віварію Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Авторкою сформовано дві однорідні групи досліджень – контрольна та дослідна, які, в свою чергу, були поділені на підгрупи в залежності від віку, а саме – молоді щури віком 1-2 місяці, дорослі щури – 6-8 місяців, старі щури – 24-26 місяців. Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили, використовуючи комп'ютерні програми Origin 7.0, TotalLab 2.01. та Microsoft Excel. Сумніву щодо достовірності отриманих результатів не виникає. Результати досліджень були узагальнені та проаналізовані, відображені у відповідних розділах дисертації. Обґрунтування актуальності обраної теми дисертації, методів дослідження, опис сучасного стану проблеми дослідження, аналітичне обговорення отриманих результатів з подальшим формуванням основних положень, висновків проведено на високому рівні з використанням достатньої кількості відповідних джерел наукової літератури – загалом 209 публікацій, з яких 148 викладені латиницею. Висновки дисертації відповідають отриманим результатам та є достатньо науково обґрунтованими.

5. Рівень виконання поставленого наукового завдання та оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності.

Основним науковим завданням дисертаційної роботи було встановити особливості морфологічних та біохімічних змін селезінки щурів за умов гіпергомоцистемії залежно від віку.

Дисертанткою застосовані загальновизнані методи дослідження, які дозволяють отримати результати відповідні завданням дослідження: гістологічний та гістохімічний – проведені для дослідження мікроскопічних

змін структури селезінки; електронномікроскопічний – для визначення ультрамікроскопічних проявів реактивних змін у селезінці щурів; біохімічний – для об'єктивної оцінки перебігу адаптивних та деструктивних процесів в селезінці щурів за умов експерименту. На високому рівні виконана обробка отриманих результатів методами математичної статистики для забезпечення передбачених описовою статистикою процедур визначення статистичної значущості розбіжностей між групами порівняння. Так само на високому науковому рівні здобувачка здійснила аналіз та узагальнення результатів дослідження з публікаціями у фахових наукових виданнях.

Таким чином, дисертантка показала високий рівень володіння методологією наукової діяльності. Поставлене у дисертації наукове завдання, на мою думку, досягнуто повністю.

6. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Отримані результати розширюють існуючі знання та надають нових відомостей стосовно розвитку негативних гісто-, ультраструктурних та біохімічних змін структури селезінки, що зумовлює необхідність в подальшому продовження досліджень щодо використання відповідних коригуючих заходів. Результати досліджень впроваджені в лекційні курси та матеріали проведення практичних занять кафедр: оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

7. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому.

Дисертація викладена українською мовою на 179 сторінках і складається з анотації українською та англійською мовами з ключовими словами, переліку умовних позначень, символів і термінів, вступу, огляду літератури, розділу

загальної методики й основних методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, розділу аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел наукової літератури та додатків. Дисертація добре ілюстрована: містить 63 рисунка та 4 таблиці.

Оформлена дисертація у відповідності до вимог до рукопису дисертації на здобуття ступеня доктора філософії, які визначені низкою нормативно-правових документів.

В анотаціях зазначена вирішена науково-практична задача, викладені отримані основні результати та положення дисертаційної роботи, з акцентом на їх новизну, практичне значення проведеного дослідження.

У вступі висвітлені актуальність теми дослідження, його мета та завдання, об'єкт, предмет та методи дослідження, зв'язок теми з науковими програмами, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, вказана апробація матеріалів дисертації та особистий внесок здобувачки у її виконанні, наведені дані щодо виданих публікацій.

У розділі огляду літератури, що складається з двох підрозділів, авторка розглядає сучасні знання щодо особливостей морфологічних змін селезінки в процесі онтогенезу, обговорює існуючі дані щодо ролі гомоцистеїну в патогенезі виникнення та прогресування уражень внутрішніх органів.

У розділі загальної методики і основних методів дослідження детально описані загальна методика та об'єкти дослідження, описані застосовані лабораторні та біохімічні методики, та розглянуті використані гістологічні, ультраструктурні і гістохімічні методики та методи статистичного аналізу результатів дослідження.

Результати виконаних особисто здобувачкою досліджень відображені у чотирьох розділах дисертації. Так, у третьому розділі, авторка описує встановлені біохімічні зміни селезінки щурів різного віку за умов гіпергомоцистеїнемії. Зокрема, визначено, що стан хронічної гіпергомоцистеїнемії супроводжується протеолітичним дисбалансом у селезінці, який виявляється у підвищенні загальної протеолітичної активності,

активності серинових, цистеїнових та аспарагінових протеаз. З метою з'ясування наявності запального процесу в селезінці було проаналізовано цитокіновий профіль органу та встановлено достовірне зниження рівнів ІЛ-1b, ІЛ-8, ІЛ-6, ІФН- γ , ІЛ-4 та ІЛ-10 у зрілих та старих щурів. За результатами, представленими в даному розділі дисертації, здобувачкою опублікована стаття в журналі, що відноситься до міжнародної наукометричної бази Scopus та двох тезах науково-практичних конференцій, які наведені у кінці розділу. Розділ інформативно проілюстрований трьома таблицями.

Результати дослідження морфологічного стану структурних компонентів селезінки щурів різних вікових груп за умов експериментальної гіпергомоцистемії представлені у четвертому розділі дисертації. Детальне вивчення змін мікроскопічної будови селезінки піддослідних тварин при тривалому підвищенні рівня гоцистеїну дозволяє зробити висновок про значний вплив даного фактору на структурні компоненти селезінки, глибина яких посилюється з віком, що проявляється дезорганізацією стромального елемента органа, загибеллю Т-лімфоцитів апоптозом, проліферацією В-лімфоцитів, інфільтрацією плазмочитів в червону пульпу, збільшенням включень ліпофусцину в макрофагах. Розділ містить 36 рисунків. За даними результатами здобувачем опубліковані дві статті у фахових наукових журналах України, один з яких відноситься до міжнародної наукометричної бази Scopus, і одних тезах науково-практичних конференцій.

Результати морфометричного аналізу гістологічних змін селезінки щурів різного віку за умов гіпергомоцистемії представлені у п'ятому розділі дисертації. За результатами обробки дискретних та безперервних даних підрахунків та вимірювань було відмічено зростання загальної площі білої пульпи, яке не було статистично достовірним. При цьому відмічено найбільш виражене зростання частки лімфоїдних вузликів відносно червоної пульпи саме у зрілих щурів. Доведено статистично достовірне збільшення кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину для всіх трьох вікових

експериментальних груп відносно груп контролю. Розділ інформативно проілюстрований трьома рисунками та однією таблицею.

Важливим в сенсі розуміння повноти картини морфологічних перебудов в селезінці на тлі гіпергомоцистемії є шостий розділ, в якому наведені дані щодо ультраструктурних змін селезінки щурів різного віку за визначених умов. Розділ містить 22 рисунки. Результати досліджень, викладені у цьому розділі, опубліковані у двох статтях у фахових наукових журналах України, один з яких відноситься до міжнародної наукометричної бази Web of Science.

У заключному, сьомому розділі дисертації здобувачкою проаналізовані та узагальнені власні результати досліджень. Розділ викладений науково грамотно, послідовно, з необхідним використанням співставлення власних результатів з існуючими результатами інших фахівців.

Висновки дисертації сформульовані чітко, відповідно до поставлених завдань, базуються на достовірному фактологічному матеріалі, аргументовані і не викликають зауважень.

Наведений список використаних джерел наукової літератури містить 209 найменувань.

Перелік наукових публікацій з основними результатами дисертації та наукових публікацій, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації, так само як і акти впровадження матеріалів дисертації (4 акти впровадження) наведені у додатках.

Дисертація в цілому є завершеною науковою працею.

8. Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці.

Результати дисертаційного дослідження рекомендуються для подальшого використання в науковій, навчальній діяльності профільних кафедр гістології, цитології та ембріології, а також біохімії закладів вищої медичної освіти України та класичних університетах, під час написання фахових публікацій, монографій.

9. Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

Під час опрацювання дисертації суттєвих зауважень щодо оформлення та змісту дисертації, які впливали б на оцінку отриманого фактологічного матеріалу, його інтерпретацію, теоретичні узагальнення та висновки немає. Виникло декілька зауважень, які не впливають на загальну позитивну оцінку роботи:

1. У 4 розділі дослідження представлені якісні рисунки, що демонструють морфологічні зміни в органі. Проте, позначки у вигляді різнокольорових стрілок та овалів часто зливаються з фоном самого рисунка. Бажано зробити лінії позначок більш товстішими та, можливо, змінити саму палітру ліній.

2. У тексті зустрічаються граматичні та орфографічні помилки, які не мають систематичного характеру, та навіть з окремими синтаксичними похибками не заважають сприйняттю наданої інформації.

У плані наукової дискусії виникло декілька запитань до дисертанта:

1. У дослідженні доведено збільшення кількості включень ліпофусцину у макрофагах, особливо у білій пульпі, на тлі гіпергомоцистеїнемії. З чим, на Вашу думку, пов'язано це явище?

2. У Вашому морфометричному розділі доведено, що спостерігалось статистично достовірне збільшення долі білої пульпи селезінки при гіпергомоцистеїнемії. Поясніть, будь ласка наявність цього феномену.

3.. Чому Ви використовували при проведенні статистичної обробки саме критерій Манна-Уїтні, а інший критерій непараметричної статистики (Вілкоксона, Спірмена тощо)?

10. Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності.

За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертації Гриценко Антоніни Сергіївни, з застосуванням програми «StrikePlagiarism.com» та проаналізованих відповідних звітів, вищезазначеного програмного

забезпечення, не було виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації та фальсифікації даних, а оригінальність дисертаційної роботи становить 72,3 %. Виявлені тільки окремі співпадиння з власними публікаціями, термінологією, посиланнями на літературу та загальноновживаними фразами. Таким чином, фактів порушень академічної доброчесності не виявлено. Подані до захисту наукові досягнення є власним напрацюванням аспірантки, а текст дисертації є оригінальним.

11. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

На підставі проведеного аналізу вважаю, що дисертація Гриценко Антоніни Сергіївни на тему: «Морфологічні зміни селезінки щурів за умов гіпергомоцистеїнемії залежно від віку» є самостійною, завершеною науковою працею, в якій отримані і обґрунтовані нові результати, які у сукупності вирішують важливу для медицини науково-практичну задачу щодо змін структури селезінки щурів різного віку, що поглиблюються на тлі хронічної гіпергомоцистеїнемії. Отримані результати досліджень та зроблені на їх основі узагальнення мають важливе наукове значення.

За актуальністю теми, обсягом та науковим рівнем виконаного дослідження й отриманих результатів, новизною отриманих результатів, їх теоретичним і практичним значенням, достовірністю висновків і положень та оформленням дисертаційна робота на тему «Морфологічні зміни селезінки щурів за умов гіпергомоцистеїнемії залежно від віку» повністю відповідає вимогам щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії, відповідно до Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою КМУ № 44 від 12 січня 2022 року та наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор Гриценко

Антоніна Сергіївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 22 Охорона здоров'я, за спеціальністю 222 Медицина.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри анатомії

з клінічною анатомією та оперативною хірургією

Полтавського державного

медичного університету

доктор біологічних наук, професор



Сергій БІЛАШ

Підпис завідувача кафедри анатомії з клінічною анатомією та оперативною хірургією Полтавського державного медичного університету, доктора біологічних наук, професора БІЛАША СЕРГІЯ МИХАЙЛОВИЧА

«ЗАСВІДЧУЮ»

Вчений секретар

доцент



Валентина ФІЛАТОВА