

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, завідувача кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ України, професора Наконечної Оксани Анатоліївни

на дисертаційну роботу

НЕКРУТ ДАР'І ОЛЕКСАНДРІВНИ «РОЛЬ ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ-1 ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ ПРОГРЕСУВАННЯ І КОРЕКЦІЇ НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ, АСОЦІЙОВАНОЇ З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ»

що подана до захисту у спеціалізовану вчену раду
К 05.600.05 Вінницького національного медичного університету
ім. М.І. Пирогова МОЗ України на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.32 – медична біохімія

1. Актуальність теми дисертації.

Дисертаційна робота Некрут Дар'ї Олександрівни присвячена вивченню ролі інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфїду в механїзмах прогресування експериментальної неалкогольної жирової хвороби печїнки (НАЖХП), асоційованої з гїпергомоцистеїнемїєю, у щурїв та з'ясуванню патогенетичних пїдходїв до її корекції гїполїпїдемїчними засобами, а саме симвастатином та омега-3-полїненасиченими жирними кислотами з полїтропними властивостями.

Вїдомо, що НАЖХП охоплює рїзний спектр захворювань печїнки та включає простий стеатоз, стеатогепатит, фїброз печїнки, цироз та гепатоцелюлярну карциному.

НАЖХП є одним їз поширених хронїчних захворювань, що об'єднує клїніко-морфологїчні змїни в органїзмі у лиць, що не зловживають алкоголь та охоплює вїд 20 до 40 % загальної популяції, зустрїчається майже в усїх вїкових групах та є вагомим фактором зростання смертності населення. Тїльки в країнах СНГ кожний рїк вїд 500 тисяч до 1 млн. людей приєднується до хворих з печїнковою патологїєю. В свїті налїчується бїльш 2 млрд. пацїєнтїв з захворюваннями печїнки, що в 100 разїв перевищує хворих з ВІЛ-їнфекцією.

В останній час НАЖХП – це домінуюче хронічне захворювання печінки у Західних країнах та в Україні тому, що стеатоз печінки пов'язаний з резистентністю до інсуліну, цукровим діабетом 2 типу, ожирінням, метаболічним синдромом. Відомо, що різноманітні хімічні речовини, зокрема лікарські препарати, а також різноманітні дієти викликають печінковий стеатоз.

На сучасному етапі розвитку медицини відомо, що розвиток НАЖХП пояснюють теорією «множинних ударів». «Першим ударом» вважають формування стеатозу через надмірну акумуляцію триацилгліцеролів в гепатоцитах; «другим ударом» - індукцію оксидативного та нітрозативного стресу, стресу ендоплазматичного ретикулума, цитокінового дисбалансу, бактеріальної ендотоксинемії, що викликають некрозапальні зміни гепатоцитів та індуюють фіброгенез; «третьім ударом» – включення генетичних та епігенетичних механізмів, які детермінують прогресування стеатозу та фіброзу, дисрегуляцію репаративних процесів в печінці.

В останні роки все більшу увагу вчених привертає те, що НАЖХП поєднується з гіпергомоцистеїнемією, яку розглядають як чинник акселерації печінкового стеатогенезу та фіброгенезу за рахунок розвитку оксидативного стресу, гіпометилування, порушення продукції вазоактивних медіаторів, мітохондріальної дисфункції. Також відома роль в регуляції функціонального стану печінки інсуліноподібного фактору росту-1 (IGF-1), який за даними літератури контролює диференціацію та проліферацію гепатоцитів, ліпідний метаболізм, проявляє антиоксидантну та цитопротекторну дію.

У сучасній літературі бракує інформації щодо ролі IGF-1 та H₂S як чинників, що можуть визначати репараційні процеси в гепатоцитах, в біохімічних механізмах НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Сучасна фармакотерапія НАЖХП передбачає використання гіполіпідемічних засобів для корекції дисліпідемії, однак їх вплив на вміст H₂S, IGF-1 та інші чинники «множинного удару» залишається не з'ясованим.

Таким чином, встановлення нових патогенетичних аспектів НАЖХП є актуальним завданням медичної біохімії і його вирішення дозволить оптимізувати підходи до корекції вказаної патології.

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

Дисертаційну роботу виконано в рамках планової НДР кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова «Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідроген сульфідів та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології» (№ держреєстрації 0113U006461) та НДР кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології «Органопротекторна ефективність та безпека метаболічних коректорів в терапії коморбідних патологічних станів» (№ держреєстрації 0114U000195). Автор є співвиконавцем вказаних тем.

3. Наукова новизна одержаних результатів та їх теоретичне значення.

Дисертаційна робота має безсумнівну наукову новизну та теоретичне значення. Зокрема, автором вперше проведено комплексне дослідження біохімічних механізмів прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та обґрунтовані підходи до патогенетичної корекції гіполіпідемічними засобами з політропними властивостями. Встановлено, що ГГЦ посилює стеатогенний ефект високожирової дієти, а саме підвищує приріст індексу маси тіла, маси вісцерального жиру, індексу ожиріння, акселерує розвиток гепато- та спленомегалії. НАЖХП, асоційована з ГГЦ, характеризується більш виразними порушеннями функціонального стану печінки, дисліпідемією, значною акумуляцією триацилгліцеролів, холестеролу та гідроксипроліну в печінці.

Автором засвідчені механізми прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, що реалізуються через чинники «множинного удару» - потенціювання оксидативного стресу, пригнічення антиоксидантної активності, підвищення прозапальної стимуляції та пригнічення продукції антифіброзних модуляторів.

Автором вперше встановлено, що за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, формується значний дефіцит H_2S в печінці та знижується рівень IGF-1 в сироватці крові. Між рівнем IGF-1 та рівнем гомоцистеїну в сироватці крові виявляється сильний обернений зв'язок. Рівень IGF-1 обернено корелює з печінковим вмістом гідроксипроліну, маркерами стеатозу печінки і прямо корелює з вмістом H_2S та активністю тіоредоксинредуктази в печінці.

Слід відзначити, що автором вперше встановлені особливості впливу гіполіпідемічних засобів, а саме симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот на рівень антифіброзних медіаторів за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Вперше експериментально доведено, що препарат омега-3 поліненасичених жирних кислот сприяє нормалізації рівня H_2S в печінці та IGF-1 в сироватці крові та зниженню рівня гомоцистеїну. Симвастатин менш ефективно впливає на рівень H_2S в печінці, не діє на рівень гомоцистеїну і потенціює зниження рівня IGF-1 в сироватці крові. Препарат омега-3 поліненасичених жирних кислот перевершує симвастатин за антистеатогенною та антифіброзною активністю за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, при гістологічному дослідженні.

4. Найбільш суттєві результати, одержані особисто здобувачем.

Дисертаційне дослідження є самостійною науковою працею, про що свідчить особистий внесок автора в її виконання. Автором особисто обрано тему, мету та завдання роботи, проведений патентний пошук та аналіз літератури, статистично опрацьовані результати дослідження, оформлено дисертацію. Автором самостійно проведено моделювання НАЖХП, виконані основні біохімічні дослідження на базі кафедри біологічної та загальної хімії і науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Морфологічні дослідження виконані за допомогою доцента Короля А.П. на базі науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

5. Ступінь обґрунтованості та достовірності одержаних результатів, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційна робота Некрут Д.О. є закінченим науковим дослідженням, яка виконана на сучасному методичному рівні. Сформульовані автором основні положення, висновки і рекомендації зроблені на підставі результатів, отриманих у дослідженнях на великій кількості дослідного матеріалу (156 щурах-самцях), науково обґрунтовані та логічно витікають із результатів досліджень. Автором використано експериментальні моделі: модель НАЖХП була створена шляхом 60-добового утримування тварин на ВЖД; гіпергомоцистеїнемію викликали введенням тваринам D, L-тіолактону гомоцистеїну гідрохлориду в дозі 100 мг/кг в/шл 1 раз на добу; модель НАЖХП, асоційованої з ГГЦ створювали шляхом 60-добового утримання тварин на ВЖД із одночасним введенням тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг в/шл раз на добу). Були проведені біохімічні дослідження біологічного матеріалу (сироватки крові, гомогенатів печінки) та морфологічні дослідження печінки щурів.

Дисертаційна робота виконана із застосуванням сучасних адекватних, необхідних для вирішення поставленої мети та завдань дослідження, методів: біохімічних (визначення активності ензимів та концентрацій метаболітів), імуноферментних (визначення вмісту інсуліноподібного фактору росту-1, гомоцистеїну, туморнекротичного фактору α), патофізіологічних, фармакологічних, морфологічних, статистичних.

Надані таблиці, рисунки переконливі, висновки конкретні і повністю підтверджуються результатами досліджень.

Експериментальна робота проведена у відповідності до основних положень біотичних норм під час проведення досліджень, регламентованими міжнародними та вітчизняними документами: Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Директивами Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що засвідчено комісією з біоетики ВНМУ ім.

М.І.Пирогова (протокол № 6 від 14.05.2017). Дослідження проведені на базі віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

Основні біохімічні дослідження проведені на базі кафедри біологічної та загальної хімії і науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №049/15 від 02.03.2015 р.). Морфологічні дослідження виконані на базі науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №050/15 від 02.03.2015 р.).

Результати роботи задокументовані цифровими даними, статистично опрацьовані з використанням комп'ютерних програм: MS Excel, SPSS22 for Windows, «STATISTICA 6,0» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA). Результати досліджень представлені у 29 таблицях, аналіз яких викладено у тексті дисертації. За результатами досліджень Д.О. Некрут сформульовані 6 висновків, які за змістом відповідають меті та 5 завданням роботи .

Таким чином, наукові положення і висновки, сформульовані автором в дисертаційній роботі, обґрунтовані та базуються на результатах власних досліджень і за суттю відповідають їм.

6. Практичне значення одержаних результатів дослідження.

Результати, одержані автором, поглиблюють сучасні уявлення про роль IGF-1 та H_2S в біохімічних механізмах прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та окреслюють нові біохімічні маркери ефективності антистеатозної та антифіброзної фармакотерапії. Обґрунтовано перспективність застосування препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот (епадолу-нео) для лікування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та встановлено недостатню ефективність симвастатину за цих умов.

Автором було розроблено нову модель НАЖХП з прискореною трансформацією стеатозу у стеатогепатит шляхом застосування ВЖД та одночасного введення тіолактону гомоцистеїну. Практичне значення

результатів даного дослідження підтверджується патентами України на корисну модель (№ 109085; №119010).

Результати дослідження впроваджені в наукову роботу та навчальний процес кафедр біологічної та загальної хімії, фармакології, патологічної фізіології ВНМУ ім. М.І. Пирогова; кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії ДВНЗ «Українська медична стоматологічна академія»; кафедри фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського», біологічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, біологічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ України.

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях та авторефераті.

Аналіз дисертаційної роботи та автореферату свідчить, що використано власні наукові публікації, у тому числі, написані у співавторстві. В кожній науковій праці, опублікованій у співавторстві, чітко зазначений внесок дисертанта. За результатами дослідження опубліковано 26 наукових праць, з них 7 статей у наукових фахових виданнях ДАК України та 1 стаття у науковому періодичному виданні іншої держави (з них 4 включені до міжнародних наукометричних баз), 16 тез в матеріалах з'їздів та конференцій, 2 патенти України на корисну модель.

8. Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на 15 наукових форумах та конгресах різного рівня (в тому числі на 2 закордонних конгресах - «Актуальные вопросы клинико-лабораторной и функциональной диагностики с клинической патофизиологией», Самарканд, 2015; «Natural science readings», Bratislava, 2016).

9. Обсяг та структура дисертації

Дисертаційна робота Некрут Д.О. складається зі вступу, аналітичного огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 3 розділів

результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних літературних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертаційної роботи - 198 сторінок друкованого тексту, з яких основна текстова частина - 140 сторінок; робота ілюстрована 29 таблицями та 21 рисунками, включає 316 джерел літератури (82 кирилицею, 234 латиницею).

Оформлення та структура представленої дисертації в цілому відповідають чинним вимогам до кандидатських дисертацій. Дисертація та автореферат викладені українською мовою, стиль описання результатів досліджень, наукових положень та висновків забезпечує доступність сприйняття роботи. Зміст автореферату відповідає змісту дисертації, у стислій формі повно відображує основні положення та висновки роботи. Технічне оформлення дисертації та автореферату якісне. Анотація до дисертації містить її ключові положення та відповідає змісту автореферату. Додатки до дисертації містять перелік друкованих робіт та оприлюднень, що повністю узгоджуються із аналогічними пунктами автореферату.

У **вступі** автором обґрунтовано актуальність дослідження, визначено предмет, об'єкт і мету дослідження, сформульовані завдання, охарактеризовано методи дослідження, розкрито суть наукової новизни дослідження, практичне та теоретичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, викладено дані щодо апробації та висвітлення матеріалів дослідження у фахових виданнях.

У **розділі 1** «Сучасні аспекти патогенезу та лікування неалкогольної жирової хвороби печінки» автор проводить аналіз сучасної наукової літератури за напрямом дисертаційної роботи, розкриває епідеміологію, патогенетичні чинники та біохімічні механізми розвитку НАЖХ. Автором критично проведено науковий аналіз ролі гіпергомоцистеїнемії в механізмах ушкодження печінки та окреслено сучасні підходи до лікування НАЖХ.

У **розділі 2** «Матеріали, моделі та методи дослідження» правильно визначено програму дослідження, обґрунтовано вибір та напрямок

дослідження. Розроблена здобувачем програма досліджень та вибраний методичний інструментарій забезпечили вирішення поставлених завдань та досягнення мети роботи.

У розділі 3 «Біохімічні механізми прогресування експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією» автором показано, що ГГЦ є вагомим чинником, який прискорює прогресування НАЖХП та трансформацію простого стеатозу у стеатогепатит. За умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, більш суттєво порушувався функціональний стан печінки, більш суттєво зростав вміст ЗХС та ТГ та знижувався вміст фосфоліпідів в печінці, підвищувався вміст гідроксипроліну в печінці. При поєднанні НАЖХП з ГГЦ формувалась дисліпідемія. Автором розкрито механізми прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, які можуть реалізуватись через потенціювання оксидативного стресу і пригнічення активності антиоксидантної системи, а також через порушення репараційного та антифіброзного потенціалу гепатоцитів шляхом зменшення вмісту H_2S в печінці, зниження рівня IGF-1 та підвищення рівня TNF- α в сироватці крові.

У розділі 4 «Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на чинники прогресування експериментальної неалкогольної хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією» висвітлені питання щодо фармакологічної корекції НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Виявлено, що застосування гіполіпідемічних препаратів ефективно зменшувало ознаки дисліпідемії із більш виразним ефектом через 28 діб. Симвастатин більш ефективно коригував рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ, а препарат ω -3 ПНЖК – рівень ТГ та ХС ЛПВЩ. Автором показано, що препарат ω -3 ПНЖК істотно перевершував симвастатин за антистеатозною та антифіброзною дією.

У розділі 5 «Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на морфологічний стан печінки у щурів з НАЖХ, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією» проведена морфологічна характеристика НАЖП.

Показано вплив симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот на морфологічний стан печінки з НАЖХ.

У розділі «Аналіз і узагальнення результатів дослідження» проведено наукове обґрунтування ролі IGF-1 та сірководню в біохімічних механізмах прогресування НАЖХ, асоційованої з ГГЦ, автор окреслює нові біохімічні маркери ефективності антистеатозної та антифіброзної фармакотерапії. Обґрунтовано перспективність застосування препарату Епадол-нео для лікування НАЖХ та встановлено недостатню ефективність симвастатину.

Аналіз дисертаційної роботи за допомогою програми для перевірки тесту на унікальність StrikePlagiat (<https://panel.plagiat.pl/web/main/printReport.html>) засвідчив унікальність тексту на рівні 87,6%.

10. Відповідність дисертації визначеній спеціальності.

За змістом, одержаними результатами та висновками дисертація відповідає паспорту спеціальності 14.01.32 – медична біохімія (медичні науки).

11. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

Суттєвих зауважень щодо оформлення дисертаційної роботи немає. Структура та зміст автореферату ідентичні тим, що наведені в дисертації.

Позитивно оцінюючи дисертацію Некрут Д.О. у цілому, слід зазначити, що в процесі рецензування роботи виникли деякі зауваження, запитання або дискусійні моменти.

1. У тексті дисертації зустрічаються поодинокі технічні та стилістичні помилки, невдалі вислови (наприклад, «зростав на рівні тенденції», «висока розповсюдженість», рівень трансаміназемії).

2. У назвах таблиць до розділу 3 доцільно було перерахувати всі використані моделі (наприклад, ВЖД, гіпергомоцистеїнемія та ВЖД,

поєднана з тіолактоновою ГГЦ), а робити акцент тільки на моделі НАЖХП в комбінації з ГГЦ.

3. Не доцільно було наводити цифрові дані щодо рівнів сечовини та білірубину (табл. 3.4), адже автор засвідчує відсутність будь-яких статистично значущих змін цих показників під час експерименту.

4. При формуванні дослідних груп доцільно було б притримуватись однакової кількості тварин (наприклад, в одній серії дослідів у автора по 14 тварин в групі, в іншій серії – по 10 тварин, при морфометричному аналізі – по 5 тварин).

В якості дискусії хотілося б почути відповідь дисертанта на **наступні питання:**

1. Для вивчення впливу гіпергомоцистеїнемії на формування НАЖХП, індукованої ВЖД, було застосовано введення тіолактону гомоцистеїну у дозі 100 мг/кг. Як Ви розраховували дозу?

2. Як Ви за балами розраховували ступінь стеатозу при морфометричному аналізі структури печінки?

3. Як Ви можете пояснити, що за умов гіпергомоцистеїнемії істотно посилюється стеатогенний ефект ВЖД? Через які механізми він реалізується?

4. Як Ви обирали дозу симвастатину для щурів (20 мг/кг)? Які можуть виникати ускладнення за умов застосування симвастатину?

Варто помітити, що виявлені зауваження не мають принципового значення й не зменшують наукові цінності рецензованої дисертації.

У цілому ж наукові положення, висновки й рекомендації, які сформульовані в дисертаційній роботі, слід вважати такими, що цілком відповідають меті та завданням дослідження.

12. Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Некрут Дар'ї Олександрівни «Роль інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфїду в механізмах прогресування і корекції неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією» є самостійним, завершеним науковим

дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове розв'язання важливого наукового завдання.

За актуальністю, об'ємом, використаними методами дослідження, новизною отриманих результатів, можливістю їх практичного використання, коректністю та достовірністю зроблених висновків в цілому відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. (із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016р.); «Вимогам до оформлення дисертації», затверджених наказом Міністерства освіти і науки України №40 від 12.01.2017 р., а її автор Некрут Дар'я Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.32 – медична біохімія.

Офіційний опонент
завідувач кафедри біологічної хімії
Харківського національного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор



Наконечна О.А.