

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

БУЛА НАЗАРА СТЕПАНОВИЧА

на тему:

**“РОЛЬ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ ЦИТОПРОТЕКЦІЇ
СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ”,**

подану до спеціалізованої вченої ради Д 05.600.02 при Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності

14.03.03 – нормальна фізіологія.

Актуальність обраної теми дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота є оригінальним дослідженням, що присвячене важливій сучасній темі – особливостям реалізації механізмів цитопротекції слизової оболонки стравоходу у аспекті регуляторного впливу газового медіатора сірководню (H_2S). Слід вказати, що обрано достатньо складний об'єкт дослідження – роль сірководню у забезпеченні бар'єрної і захисної функцій слизової оболонки стравоходу (СОС), що визначають діапазон адаптаційно-компенсаторних реакцій організму до дії екстремальних чинників у аспекті зміни каталітичної активності біосинтезу H_2S . До сьогодні остаточно не існує єдиного трактування складних механізмів цитопротекції, порушення яких сприяє виразкоутворенню, змінам проліферації та гоєння, про що свідчить не дивлячись на значні здобутки сучасної медицини динаміка збільшення поширеності хвороб стравоходу, включно зі стравохodom Барретта у останні роки. Та попри такий актуальний статус дослідження регуляторної ролі H_2S для цитопротекції SOS не набули належної розробки в сучасному українському науковому середовищі.

Пояснити це можна складністю постановки самих досліджень, багатогранністю ефектів, спричинених біодоступністю сірководню. Вкрай важливим у рецензованій роботі є спроба відтворити у тварин зміни бар'єрної функції стравоходу, що були співвідносними з проявами хвороб людини, і пріоритетні дані про екзогенний вплив сполук, які володіють здатністю покращувати біосинтез сірководню та сприяють підвищенню опірності бар'єрної та захисної функцій стравоходу, зменшуючи прояви запальних реакцій. Адже зниження чутливості СОС до цитоагресивного впливу ейкозаноїдів за умов використання гібридних сполук, якими є H₂S-асоційовані нестероїдні протизапальні засоби з терапевтичною протизапальною активністю і здатністю потенціювати утворення сірководню, є незаперечним доказом участі H₂S у регуляції цитопротекції СОС.

Значення отриманих даних у аспекті вирішуваних фундаментальних питань і практичного застосування результатів дозволяє зробити висновок про актуальність рецензованої роботи.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.

Дисертаційна робота зареєстрована як ініціативна наукова тематика, що виконується у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького (ЛНМУ) за № державної реєстрації: 0116U004510 «Дослідження ролі системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостатування функціонально-метаболічних параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи» (2016–2021 pp.) і виконувалась за № державної реєстрації: 0111U000121 ІН 25.01.0001.11 «Дослідження функціонально-метаболічних резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних засобів корекції» (2011–2015 pp.,).

Новизна дослідження та отриманих результатів.

Проведені дослідження автором дозволили отримати достатню кількість принципово нових фактів, важливих для розвитку наукових положень про регуляторну роль H₂S у клітинно-молекулярних механізмах цитопротекції та захисних функцій СОС, індукованих H₂S, та можливість моделювання неерозивного езофагіту за рахунок гальмування систем H₂S/цистатіонін-γ-ліази, H₂S/цистатіонін-β-сінтази, що спричиняє руйнування природних захисних властивостей SOS і порушення адаптаційно-компенсаторних механізмів через індукцію деструктивних змін епітеліального бар'єра, ендотеліальної дисфункції та зміни цитокінової регуляції GCP-2, IL-6, IL-10 і IL-17.

Вперше показано руйнування бар'єрої та захисної функцій SOS після застосування тетрахлорметану, моделювання змін вмісту ейкозаноїдів і активності систем H₂S/цистатіонін-γ-ліази та H₂S/цистатіонін-β-сінтази.

Вперше виявлено значення H₂S в адаптаційно-компенсаторних механізмах бар'єрої та захисної функцій стравоходу, секреції прозапального інтерлейкіну IL-6 та ангіогенного білка GCP-2 і встановлено спряжені з активністю систем H₂S/CSE та H₂S/CBS їх зміни.

Вперше експериментально показано, що застосування донора H₂S натрій сульфіду (NaHS) сприяє цитопротекції SOS, асоційованій зі змінами вмісту GCP-2 і IL-6, IL-10 і IL-18, які опосередковують про- та протизапальні зміни в організмі.

Вперше виявлено, що застосування H₂S-асоційованих нестероїдних протизапальних препаратів знижує чутливість SOS до цитоагресивного впливу порівняно до дії класичних аналогів. На основі отриманих даних стверджується, що за тривалого введення H₂S-асоційованих нестероїдних протизапальних препаратів зберігається терапевтична протизапальна активність і зменшується деструкція SOS.

Практичне значення результатів дослідження.

Одержані результати автора мають не лише теоретичну новизну роботи, а й свідчать про органічне поєднання з науково-практичним значенням і перспективою їх подальшого використання в практичній медицині.

Результати дослідження допомогли теоретично та методологічно обґрунтувати новий спосіб моделювання неерозивного езофагіту та медикаментозної езофагопатії у тварин, який можна рекомендувати для практики доклінічних досліджень лікарських засобів. Встановлені фундаментальні закономірності регуляторної ролі H_2S допомагають краще зрозуміти механізми бар'єрної функції СОС, що може сприяти розробці нових способів профілактики й лікування неерозивного езофагіту та медикаментозної езофагопатії, що має значний внесок у знання сучасної фізіології та медицини загалом.

Дані про вплив донора сірководню $NaHS$, H_2S -напроксену і H_2S -аспірину можуть стати основою для створення і впровадження у практичну медицину нових безпечних лікувально-профілактичних засобів.

Отримані дисертантом результати дослідження заслуговують використання в навчальному процесі студентів кафедр фізіології медичних університетів України. На даний час впроваджено в Івано-Франківському національному медичному університеті, Дніпропетровській медичній академії, Буковинському державному медичному університеті, Тернопільському державному медичному університеті імені І.Я. Горбачевського, Харківському національному медичному університеті.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації, їх достовірність, повнота викладу в публікаціях.

Дисертаційна робота побудована методично правильно і відповідає науковому рівню. Представлені у дисертації аргументовані положення,

ґрунтуються на аналізі сучасних і класичних літературних джерел і матеріалів власних досліджень. Методичні підходи відповідають поставленим завданням і вимогам для отримання наукових даних. Матеріал добре репрезентативній на великому об'ємі одержаних даних. Коректна статистична обробка автором цифрового матеріалу результатів досліджень відповідними методами статистичного аналізу у ліцензійному програмному пакеті “STATISTICA 5.0” дала можливість дійти до формулювання обґрунтованих і достовірних положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційна робота Н.С. Була є завершеним фундаментальним дослідженням, оформлена згідно існуючих положень «Основних вимог до дисертацій та авторефератів дисертацій» ДАК України. Вона складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, методів досліджень, двох розділів власних результатів досліджень, розділу присвяченому аналізу і узагальненню результатів, висновків, списку літератури, який складається із 296 найменувань (з них 263 – латиницею) та двох додатків. Дисертація ілюстрована: 39 рисунками та 5 таблицями. Статистичний аналіз проведений відповідним чином. Висновки сформульовані на результатах роботи дисертанта і відповідають завданням. Результати роботи нашли відображення у 21 друкованій роботі, з них 8 статей: 5 – у вітчизняних журналах, 3 – у закордонних журналах, що індексуються Scopus (PloS One, Inflammopharmacology, Folia Medica Cracoviensia), решта – тези доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, де було викладено і обговорено основні положення, результати дослідження та висновки.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.

Структура та оформлення дисертації та її автореферату відповідають «Основним вимогам до дисертацій та авторефератів дисертацій» ДАК України. Роботу викладено українською мовою на 165 сторінках друкованого тексту, з яких 105 сторінок – основний текст. Зміст, методичні засади виконаних досліджень і результати роботи відповідають спеціальності 14.03.03 – нормальні фізіологія. Структура дисертації виразна і зрозуміла. Доданий ілюстративний матеріал у формі рисунків та таблиць за суттю і тлумаченнями допомагає розумінню змісту представленого матеріалу.

У анотації роботи подано найважливіші результати дослідження та підкреслено їхню новизну. У вступі, який викладено на 6 сторінках і містить всі складові, рекомендовані ДАК України, а саме: обґрунтування актуальності проблеми дисертації; зазначення зв'язку роботи з науковими темами; формулювання мети та завдань дослідження; визначення об'єкту, предмету і перелік використаних методів дослідження зі стислою конкретизацією необхідності їх застосування; відображення наукової новизни отриманих результатів та їх практичного значення; зазначення особистого внеску здобувача; перелік наукових форумів, де були апробовані основні положення роботи; надання відомостей щодо публікацій дисертанта за матеріалами дисертації, автор поряд з описом сучасного стану і актуальності вирішуваних питань чітко окреслює мету та п'ять завдань своєї роботи.

Огляд літератури складається з чотирьох підрозділів і свідчить про те, що Була Н.С. опрацював усю важливу сучасну доступну наукову літературу, яка стосується предмету дисертації і багатофакторного аналізу чинників цитопротекції слизової оболонки стравоходу та впливу сірководню на травну систему загалом, механізмів розвитку порушень бар'єрної функції стравоходу медикаментозного генезу і проблеми розробки новітніх

фізіологічно-обґрунтованих езофагопротекторних засобів. Завершує огляд літератури короткий підсумок, який переконує нас в необхідності подальших досліджень з питання впливу H_2S на формування бар'єрної функції стравоходу, як об'єднувальної ланки між вазотропним та епітеліальним її компонентами, забезпечуючи активування протизапальних реакцій та можливості використання такого ефекту для розробки фізіологічно-обґрунтованих засобів цитопротекції СОС.

В розділі „*Матеріали і методи дослідження*” дисертант подає опис етапів та серій дослідження із ретельною характеристикою досліджуваних сполук H_2S -асоційованих похідних нестероїдних протизапальних препаратів (H_2S -напроксену і H_2S -аспірину). Робота ґрунтуються на результатах експериментів, а саме на модифікуванні ендогенного синтезу H_2S , ейкозаноїдів та їхньому поєднанні з індукцією гострого стресу, що застосовували для вивчення адаптаційно-компенсаторних реакцій стравоходу під час модуляції природної біодоступності сірководню, визначення змін бар'єрної функції стравоходу за кількісно-якісними критеріями, вмісту інтерлейкінів: прозапальних – IL-6, IL-17, протизапального – IL-10, хемокіну – GCP-2. Ретельно описані застосовані методи дослідження: фізіологічні, морфологічні (комплексний гістологічний індекс ураження з урахуванням ступеня візуально-аналогових змін), імунохімічні (імуноферментного аналізу). Вірогідність отриманих результатів та висновків роботи підтверджується коректною статистичною обробкою. Доцільність у застосуванні запропонованих методик та методологічних підходів не викликає ніякого сумніву.

Розділ 3 «Особливості бар'єрної та захисної функцій слизової оболонки стравоходу за умов модифікації вмісту сірковмісних сполук», який викладено на 24 сторінках і складається з трьох підрозділів, в яких описані результати вирішальної ролі H_2S для бар'єрної функції стравоходу і захисних реакцій відповідно до поставлених завдань. Дані отримані автором вказують, що

використання гібридної сполуки H₂S-напроксену зменшує ознаки деструктивних пошкоджень у стравоході порівняно до дії класичного напроксену. Це може бути пов'язано з тим, що додаткова активна група сполуки, яка є донором H₂S, викликає виразний вазотропний ефект і сприяє обмеженню руйнуванню СОС, нівелює прояви запалення. Також показано, що за умов гіперглікемії та поєдання гальмування H₂S/CSE і H₂S/CBS систем біосинтезу H₂S виникає руйнування цілісності епітеліального бар'єру стравоходу, що може свідчити про важливу роль сірководню у механізмах захисту проти цитоагресивного впливу та розвитку запалення, тому такий спосіб може використовуватись для моделювання неерозивного езофагіту у тварин.

У описі результатів дослідження, що в розділі «Вплив сірководню на слизову оболонку стравоходу за умов дії ульцерогенних чинників і після введення гібридних сірковмістних сполук напроксену і ацетилсаліцилової кислоти», який викладено на 20 сторінках і складається з чотирьох підрозділів, автором представлено результати адаптаційно-компенсаторних реакцій бар'єрної функції стравоходу в умовах введення гібридних сполук H₂S-асоційованих нестероїдних протизапальних похідних, які дозволяють зрозуміти роль H₂S у цитопротекторних механізмах формування бар'єрної функції СОС і зробити припущення про доцільність подальшого доклінічного та клінічного вивчення таких сполук. На основі дослідження порівняльної характеристики впливу сірководня на показники цитокінів за умов екстремального впливу на бар'єрну функцію слизової оболонки стравоходу (цитолітична дія напроксену та H₂S-напроксену, ацетилсаліцилової кислоти та H₂S-ацетилсаліцилової кислоти без та за умов поєдання індукції впливу стресу) виявили, що вміст IL-6 та GCP-2 має прогностичну цінність і Була Н.С. припускає, що дані параметри можна використовувати як неінвазивний маркер порушень захисних властивостей СОС.

У наступному розділі «*Аналіз узагальнення результатів дослідження*» Н.С. Була підсумовує результати проведених досліджень, порівнюючи їх з даними інших дослідників, підкреслює нові дані одержані під час виконання дисертаційної роботи. Автор також, логічно обґруntовує фізіологічні механізми формування бар'єрної функції стравоходу у аспекті адаптаційно-компенсаторних можливостей за природної дії H_2S та екзогенного введення сполук донорів сірководню. Логічно обґруntовує важливість апробації сполук, що мають гібридні властивості протизапальних (від основної “батьківської” сполуки), і протизапальних ефектів за рахунок дії сірководню для розробки безпечних засобів протизапальної дії, що виявлятимуть цитопротекторний вплив у СОС. Обговорення результатів дослідження дозволило авторові зробити аргументовані висновки, які сформульовані достатньо чітко, переконливо і відповідають меті та завданням дисертаційної роботи. Представлені автором шість висновків відображають основні результати роботи.

Додатки містять список наукових праць, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації та перелік наукових публікацій, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації на наукових форумах, а також акти впровадження результатів дослідження у навчальний процес кафедр фізіології України.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації та автореферату.

Принципових недоліків і зауважень у змісті та оформленні дисертації та автореферату немає. При їхньому розгляді виникла необхідність звернути увагу на деякі зауваження, які не впливають на загальну позитивну оцінку роботи:

1. Доцільно було б подивитись вплив блокади третього шляху утворення ендогенного сірководню - ферменту 3-меркаптопіруват

сульфуртрансферази, що локалізований в мітохондріях і з яким пов”язують захисний ефект сірководню.

2. Чому автор для оцінки впливів сірководню скористався таким показником як гематокрит?

3. Гідросульфіт натрію (NaHS) є донором сірководню і використовується для збільшення його вмісту в тканинах а не для “збільшення ендогенного синтезу H_2S ”.

4. Автор часто використовує таке висловлювання як “бар“єрна функція страховоду” коли мова стосується слизової оболонки страховоду.

5. Текст дисертації та автореферату містить поодинокі друкарські помилки, невдалі вислови, русизми і латинізми. Наприклад –“ роботи мітохондріальної пори”-- мова йде про утворення пори, “уперше підтверджено значення H_2S ”-- мова йде що вперше показано, “вилучення $\text{H}_2\text{S/CSE}$ системи ”—мова йде про блокаду ферменту.

6. У рамках загальної дискусії хотілось почути думку автора стосовно які перспективи має застосування отриманих даних про зміни вмісту цитокінів у аспекті модуляції дії сірководню на формування цитопротекторних властивостей СОС і рухової діяльності стравоходу?

7. Чи відомо Вам про дані фармакокінетики та клінічних досліджень апробованих у Вашій роботі сполук -- H_2S -напроксену та H_2S -ацетилсаліцилової кислоти?

Зроблені зауваження та запитання не носять принципового характеру і не впливають на загальну високу оцінку рецензованої роботи і лише підкреслюють її теоретичне і практичне значення.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертаційна робота Була Н.С. «Роль гідроген сульфіду в механізмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу» за своєю актуальністю,

об'ємом і значимістю отриманих результатів є самостійним, оригінальним, завершеним науковим дослідженням, яке за науковою новизною, теоретичною та практичною значимістю одержаних результатів має вагоме значення для сучасної фізіології, в тому числі і для фізіології травлення, пошуку нових фізіологічно обґрунтованих засобів цитопротекторної дії. Зважаючи на актуальність і перспективність тематики дисертаційної роботи, наукову новизну отриманих автором результатів, зв'язок з науковими темами і широке висвітлення результатів у вітчизняній та світовій науковій літературі, обговорення на численних міжнародних форумах вважаю, що дисертація відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 (зі змінами, внесеними в Постановах КМ № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016), щодо кандидатських дисертацій, а її автор Була Назар Степанович заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю – 14.03.03 – нормальна фізіологія.

Офіційний опонент

член-кор. НАН України, доктор медичних наук, професор, завідувач відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

 В.Ф. Сагач



Підпис проф. Сагача В.Ф. засвідчує

Вчений секретар

Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця

НАН України , канд.мед.наук

 В.І. Портніченко