

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

БУЛА НАЗАРА СТЕПАНОВИЧА

на тему:

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

подану для здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі
спеціальності 14.03.03 – нормальна фізіологія,
до спеціалізованої вченої ради Д 05.600.02 при Вінницькому
національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ) посідає перше місце у структурі патології верхніх відділів шлунково-кишкового тракту і кислотозалежних захворювань. Враховуючи зростання поширеності ГЕРХ, її негативний вплив на якість життя хворих, збільшення ризику злоякісних новоутворень стравоходу, важливим завданням експериментальної гастроентерології є дослідження механізмів цитопротекції та розвитку деструктивних змін в слизовій оболонці стравоходу (СОС).

Іншою актуальною проблемою є розвиток ерозивних та виразкових ушкоджень проксимальних відділів шлунково-кишкового тракту у зв'язку з широким застосуванням нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), ульцерогенна дія яких суттєво посилюється при перебуванні організму в умовах стресу.

Фізіологічні механізми цитопротекції в СОС та патофізіологічні механізми порушення бар'єрної і захисної функцій стравоходу, які призводять до розвитку його патології, остаточно не з'ясовані.

Останнім часом при вивченні механізмів цитопротекції в шлунково-кишковому тракті все більша увага приділяється гіdroгену сульфідy (сірководню, H_2S). В організмі сірководень приймає активну участь у багатьох фізіологічних процесах. Проте, незважаючи на велику кількість публікацій, пов'язаних із дослідженням ролі H_2S в травній системі, стан бар'єрної функції та захисних реакцій СОС за умов дефіциту H_2S та впливу ульцерогенних чинників ще не досліджувався. Це дало підстави висловити гіпотезу про можливу участь H_2S у механізмах цитопротекції в СОС та роль дефіциту H_2S в механізмах її пошкодження.

Для перевірки даної робочої гіпотези необхідно, по-перше, змодельовати на тваринах такі пошкодження СОС, які були б тотожні клінічним проявам ГЕРХ у людей. По-друге, необхідно також дослідити стан СОС при її пошкодженнях за умов ендogenous дефіциту H_2S або надлишку H_2S . Нарешті, враховуючи широке використання в медичній практиці ацетилсаліцилової кислоти (АСК) та класичних НПЗП, які при тривалому вживанні порушують цілісність СОС, важливим завданням є пошук засобів для зменшення ризику розвитку таких пошкоджень.

Тривале застосування антисекреторних препаратів та прокінетиків при лікуванні хворих на ГЕРХ викликає ряд побічних ефектів – гіпергастринемію, порушення мікробіоценозу, зниження ензимної активності шлункового соку. У зв'язку з цим важливим є пошук засобів, здатних посилювати механізми фізіологічної цитопротекції в СОС. З огляду на результати попередніх досліджень, перспективним напрямком езофагопротекції може виявитись застосування нового класу гібридних НПЗП, які містять сірководень – так званих H_2S -асоційованих НПЗП. Проте ні роль H_2S у механізмах фізіологічної цитопротекції, ні патофізіологічні механізми пошкодження СОС за умов дефіциту H_2S , ні ефективність сполук, які є донорами

H₂S (гібридні НПЗП, NaHS), щодо попередження пошкоджень СОС при тривалому застосуванні АСК і НПЗП є не з'ясованими. Це обґрунтовує актуальність і необхідність проведення даного дисертаційного дослідження.

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

Напрямок досліджень і тема дисертації Була Н.С. відповідають основним напрямкам наукових досліджень кафедри нормальної фізіології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького. Зокрема, дисертаційне дослідження є частиною планових науково-дослідних робіт як «Дослідження функціонально-метаболических резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних засобів корекції» (N держреєстрації 0111U000121) та «Дослідження ролі системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостаткування функціонально-метаболических параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи» (N держреєстрації 0116U004510).

Тема і план виконання дисертації затверджені Вченою радою медичного факультету N 2 Львівського національного медичного університету 17 березня 2014 р.

Дисертант виконував фрагменти щодо вивчення структурно-функціональних особливостей стану бар'єрної та захисної функцій слизової оболонки стравоходу при моделюванні її пошкоджень, дефіциту ендogenous H₂S, за умов стресу, однократного і тривалого (протягом 9 діб) застосування як класичних, так і гібридних (асоційованих з H₂S) ацетилсаліцилової кислоти та напроксену.

Новизна дослідження і отриманих результатів.

У дисертаційному дослідженні використано різні експериментальні моделі для відтворення пошкодження цілісності СОС – тетрахлорметан, пролонгована гіперглікемія, водно-імобілізаційний стрес, 9-денний прийом АСК або напроксену. За умов моделювання пошкодження СОС вперше встановлено важливу роль гідрогену сільфідру (H_2S) як одного із чинників цитопротекції в СОС. Одночасно з цим доведено, що дефіцит H_2S , який настає внаслідок блокування активності ферментів його синтезу, є патофізіологічною ланкою порушень бар'єрної і захисної функцій стравоходу, механізмів цитопротекції в СОС. Це дозволило дисертанту розробити експериментальну модель неерозивного езофагіту, яка полягає у блокуванні систем біосинтезу H_2S в слизовій оболонці стравоходу.

Новими також є дані про активацію запалення в СОС за умов зниження біосинтезу H_2S . Про це переконливо свідчить зростання рівнів прозапальних цитокінів (IL-6, IL-17 та GCP-2) та зниження рівня протизапального IL-10.

В дисертаційній роботі вперше доведено цитопротекторний вплив на СОС донора гідрогену сульфідру NaHS або гібридних сполук, що містять H_2S (H_2S -АСК, H_2S -напроксен). Гібридні H_2S -асоційовані сполуки при тривалому застосуванні (9 діб) не викликали пошкоджень СОС, характерних для класичних НПЗП. Встановлений цитопротекторний вплив NaHS та H_2S -асоційованих сполук зумовлений збільшенням біодоступності гідрогену сульфідру в СОС, зменшенням інтенсивності реакцій запалення, що підтверджено зниженням рівнів прозапальних цитокінів.

Таким чином, завдяки отриманим новим даним обґрунтовано інноваційний метод цитопротекції в СОС – застосування засобів, які підвищують рівень сірководню в слизовій стравоходу.

Практичне значення результатів дослідження.

По-перше, розроблені експериментальні моделі для відтворення пошкоджень СОС у вигляді неерозивного езофагіту та езофагопатії, які співвідносні з клінічними проявами ГЕРХ, а тому можуть бути використані в доклінічних дослідженнях лікарських засобів.

По-друге, запропоновано новий експериментально обґрунтований метод цитопротекції в СОС, який полягає у збільшенні вмісту сірководню в слизовій стравоходу, що досягається введенням донора H_2S ($NaHS$) або застосуванням H_2S -асоційованих сполук (H_2S -АСК, H_2S -напроксену).

Крім зазначеного вище, практичне значення дослідження полягає у тому, що його результати впроваджені в навчальний процес кафедр фізіології кількох медичних вишів України, що підтверджено відповідними актами.

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

Наукові положення дисертаційної роботи логічні, обґрунтовані і аргументовані викладеними в ній результатами власних досліджень. Робота виконана на високому методологічному рівні, використано ряд сучасних та інформативних фізіологічних, масометричних, гістологічних, імуноферментних методів досліджень. Отримані дані опрацьовані загальноприйнятими статистичними методами, якими доведено їх достовірність.

Зроблені висновки відповідають поставленим завданням, конкретні, сформульовані чітко, відповідають отриманим результатам. Матеріал в цілому добре ілюстрований.

Результати дисертаційного дослідження, наукові положення і висновки повністю висвітлені у 21 опублікованих працях, серед яких вісім статей у фахових наукових виданнях, у т.ч. три статті у закордонних журналах, які індексовані у Scopus, та п'ять статей у вітчизняних журналах. Результати, основні положення, висновки були представлені та всебічно обговорені на вітчизняних і міжнародних наукових форумах.

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

Дисертаційна робота побудована і оформлена відповідно до вимог ДАК України. Викладена державною мовою на 165 сторінках тексту, з яких 64% становить основний текст.

Структура роботи чітка і відповідає сучасним вимогам: титульна сторінка, анотації українською та англійською мовами, зміст, перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, розділ «Матеріал і методи дослідження», два розділи результатів власних досліджень, розділ «Аналіз узагальнення результатів дослідження», висновки, список використаних літературних джерел, додатки.

Анотації містять лаконічне обґрунтування дослідження, визначення мети, основних завдань, об'єкту та предмету дослідження, матеріалу, методів та методології. Чітко представлені основні результати, при цьому акцентовано їх наукову новизну, практичне значення і перспективи подальшого використання.

У вступі (6 сторінок), структура якого цілком відповідає вимогам ДАК, більш детально обґрунтовано актуальність проблеми та обраного напрямку дослідження, показано зв'язок роботи з науковими темами, визначено мету і перераховано п'ять завдань дослідження, об'єкт,

предмет і методи дослідження, чітко сформульовано наукову новизну отриманих результатів та їх практичне значення, відображено особистий внесок здобувача, дані щодо апробації та публікації основних результатів, наукових положень та висновків, дані про структуру роботи, її об'єм, використаний ілюстративний матеріал.

Огляд літератури на 15 сторінках включає чотири підрозділи, в яких вдало охарактеризовано і узагальнено сучасні літературні дані, що стосуються проблеми і теми дисертаційного дослідження. Викладено результати попередніх досліджень про механізми цитопротекції та ульцерогенезу в СОС. При цьому особлива увага приділена дослідженням, які вказують на роль сірководню у забезпеченні бар'єрної та захисної функцій слизової оболонки шлунково-кишкового тракту. Також розглянуто сучасний стан досліджень механізмів розвитку медикаментозної езофагопатії при застосуванні НПЗП. Проведено аналіз проблеми щодо розробки езофагопротекторних засобів, ефективність застосування яких ґрунтується на їх участі у фізіологічних механізмах цитопротекції. До цих сполук дисертант гіпотетично відносить гібридні H_2S -асоційовані НПЗП (H_2S -АСК, H_2S -напроксен). Завершується огляд коротким узагальненням, обґрунтуванням основних завдань дисертаційного дослідження.

У розділі *«Матеріал і методи дослідження»*, викладеному на 19 сторінках, представлено всі елементи дизайну дисертаційного дослідження: етапи, характеристика експериментальних груп тварин, методи моделювання пошкодження СОС, методи відтворення дефіциту сірководню, схеми застосування класичних АСК і напроксену, гібридних H_2S -АСК та H_2S -напроксену, модель відтворення водно-іммобілізаційного стресу. Описано використані у роботі масометричні, морфологічні, імуноферментні методи визначення вмісту

прозапальних і протизапальних цитокінів, представлено методи статистичного аналізу отриманих даних. В цілому необхідно відзначити високий методологічний і методичний рівень проведеного дослідження.

У розділі 3 (три підрозділи, 24 сторінки тексту) представлено результати власних досліджень дисертанта, які переконливо доводять важливу роль сірководню у забезпеченні цілісності СОС при моделюванні її пошкоджень введенням тетрахлорметану, застосуванням гіперкалорійного високовуглеводного харчування (ГВВХ), введенням НПЗП напроксену і, особливо, при його поєднанні з гострим водно-іммобілізаційним стресом. Показано, що дефіцит сірководню, який виникає при блокуванні активності ферментів його біосинтезу, призводить до посилення пошкоджень СОС, тоді як введення донора сірководню NaHS їх послаблювало. Цитопротекторний ефект щодо СОС також проявляла гібридна сполука H₂S-напроксен, яка теж є донором H₂S. Встановлено, що на відміну від класичного напроксену, H₂S-напроксен не посилював, а, навпаки, зменшував деструктивні зміни в СОС. В цьому ж розділі показано, що цитопротекторна дія донорів сірководню реалізується внаслідок зменшення вмісту прозапальних цитокінів IL-6 та GCP-2, збільшення рівня протизапального IL-10, тобто внаслідок зменшення проявів запалення.

У 4-му розділі (чотири підрозділи, 25 сторінок) викладено результати досліджень впливу сірководню на стан СОС при моделюванні її медикаментозних ушкоджень однократним або тривалим (протягом 9 діб) застосування АСК або напроксену. Деструктивна дія на слизову стравоходу АСК та напроксену в цих експериментах посилювалась при індукуванні водно-іммобілізаційного стресу. Показано, що застосування донорів сірководню (NaHS, H₂S-

напроксену, H_2S -АСК) в цих умовах призводить до зменшення проявів запалення та деструктивних змін в СОС порівняно з ефектами, які викликають АСК або напроксен. Отримані дані обґрунтовують перспективу подальшого до клінічного та клінічного вивчення ефективності H_2S -асоційованих сполук. Вони також підтверджують важливу роль H_2S як одного із чинників фізіологічної цитопротекції в СОС.

У розділі 5 (13 сторінок) проведено узагальнення результатів дослідження. Дисертант обговорює основні наукові положення і результати з використанням сучасних літературних даних, акцентує увагу на новизні власних досліджень і одержаних результатів, їх практичному значенні.

На підставі обговорення результатів дослідження зроблено чіткі обґрунтовані *висновки*, що відповідають меті та поставленим у роботі завданням.

Список посилань на літературні джерела містить 296 найменувань, з яких 263 латиницею. Більшість робіт, які процитовані в дисертації, опубліковані протягом останніх 10 років.

Додатки включають список наукових праць дисертанта, в яких опубліковані основні наукові результати та перелік наукових публікацій, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації. Тут також надано копії актів впровадження результатів дослідження у навчальний процес кафедр фізіології медичних вишів України.

Таким чином, дисертаційна робота є цілісним завершеним дослідженням. Її зміст і оформлення відповідають вимогам ДАК України. Автореферат стисло відображує основні результати і положення дисертаційної роботи.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації та автореферату.

Принципових недоліків і зауважень щодо змісту та оформлення дисертації й автореферату немає.

Непринциповими зауваженнями є такі:

1. Наявність в дисертації невдалих висловів, наприклад, «особливості фізіологічних механізмів ...ульцерогенезу в стравоході» (назва підрозділу 1.1), «фізіологічні механізми розвитку медикаментозної езофагопатії» (назва підрозділу 1.3), «спрямованість протизапальних реакцій за вмістом ІЛ-6» (підрозділ 4.2), «виразний цитопротекторний вплив на бар'єрну функцію» (анотація, с.5 та останнє речення висновку 6), «актуальним напрямком стає селективна оптимізація побічних ефектів» (с. 37, абзац 1), тощо, а також граматичних помилок у 5-му розділі. Елементи рис. 5.1 дрібні, суть рисунка не пояснено в тексті.

2. Цифрові дані власних досліджень бажано представляти також в таблицях, а не лише на рисунках. У підрозділі 3.1 відсутні цифрові дані, крім відносної маси стравоходу.

3. Моделювали стан гіперглікемії як фактора пошкодження СОС шляхом високовуглеводної дієти, проте не представлено результати рівня глюкози в крові в динаміці.

4. Дані щодо змін гематокриту, як ознаку геморагії, варто доповнювати також результатами динаміки гемоглобіну і еритроцитів.

5. Окремі фрази, як «збільшення кількості введень ASA (ацетилсаліцилової кислоти, АСК) сприяє збільшенню проявів прозапальних реакцій» (розділ 4, передостанній абзац на сторінці де рис. 4.19) варто ретельніше обґрунтовувати.

Зроблені зауваження не впливають на загальну високу оцінку рецензованої роботи.

В процесі рецензування роботи виникли кілька запитань, на які прошу дисертанта дати відповіді.

1. Назва роботи «Роль гідрогену сульфідів в механізмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу». Прохання пояснити, через які механізми реалізується цитопротекторний вплив сірководню на СОС.

2. В дисертації вживаються такі терміни: «бар'єрна функція слизової оболонки стравоходу», «захисна функція слизової оболонки стравоходу», «адаптаційно-компенсаторні реакції слизової оболонки стравоходу», «цитопротекторні функції слизової оболонки стравоходу». Дайте будь ласка чітке визначення цих термінів.

3. Що дало моделювання біодоступності сірководню для змін показників цитокінів IL-6 та GCP-2 і який з них варто вважати ключовим для вирішення поставлених завдань роботи?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Була Н.С. «Роль гідроген сульфідів в механізмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу» є завершеним, оригінальним, самостійно виконаним науковим дослідженням, яке за науковою новизною, теоретичною та практичною значимістю одержаних результатів має вагоме значення для сучасної фізіології травлення.

В дисертаційному дослідженні вирішено важливе наукове завдання – доведено важливу роль гідрогену сульфідів в забезпеченні механізмів цитопротекції слизової оболонки стравоходу, а також

науково обґрунтовано новий напрямок цитопротекції – застосування сполук, що містять H_2S , у якості донорів сірководню.

Враховуючи актуальність обраного напрямку дослідження і теми дисертаційної роботи, наукову новизну отриманих результатів та їх практичне значення, перспективу подальшого використання, зв'язок з науковими темами, достатнє висвітлення результатів у вітчизняній та світовій науковій літературі, обговорення результатів на багатьох наукових 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

доктор медичних наук, професор,
заступник директора з наукової роботи,
провідний науковий співробітник відділу
клінічної фізіології та патології внутрішніх
органів ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф.
Чеботарьова НАМН України»

В. Б. Шатило

Підпис проф. Шатило В.Б. засвідчую

Зав. відділом кадрів

ДУ «Інститут геронтології ім.

Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»



В.М. Приходько

