



ВІДГУК

офіційного опонента Кучменко Олени Борисівни,

доктора біологічних наук, професора, провідного наукового співробітника відділу імунології та біохімії ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології ім. акад. М.Д. Стражеска» НАМН України на дисертаційну роботу Зайцевої Ольги Володимирівни «Особливості розвитку і корегування оксидативно-нітрозативного стресу за експериментального остеопорозу», подану на здобуття ступеня кандидата біологічних наук до спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 при Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України за спеціальністю 03.00.04 - біохімія

Актуальність теми. Актуальність обраної дисертантом теми не викликає сумнівів, оскільки вивчення механізмів виникнення і розвитку остеопорозу на сьогодні є однією із нагальних проблем сучасної медичної науки. Це захворювання супроводжується порушенням функціонування клітин кісткової тканини, формування органічного матриксу та демінералізацією кісток. Вітаміну D₃ у таких процесах відводиться роль імуномодулятора, регулятора фосфорно-кальцієвого метаболізму та диференціації практичної більшості типів клітин організму. Важливим аспектом в механізмах розвитку патологій кісткової тканини є вивчення ролі в них активних форм кисню і нітрогену, зокрема NO. З'ясувалось, що NO разом з вже давно відомими властивостями є також важливим регулятором метаболізму кісткової тканини. Саме цей аспект є недостатньо дослідженим. Недослідженим також залишається вплив ендогенної гіперпродукції NO в організмі, яка може бути індукована введенням ліпополісахариду або інших ендотоксинів бактеріальної природи, наприклад вакцини БЦЖ (Bacillus Calmette-Guérin), на метаболізм кісткової тканини та організму в цілому.

Для розуміння механізмів виникнення і розвитку остеопорозу та можливостей попередження виникнення його ускладнень, важливим є дослідження мінерального обміну, про- і антиоксидантних процесів,

постсинтетичних модифікацій протеїнів, процесів синтезу органічного матриксу тощо. Все це і обумовлює актуальність дисертаційного дослідження Зайцевої О.В.

Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота виконувалася впродовж 2012 – 2015 рр. в рамках бюджетних наукових тем відділу регуляції обміну речовин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: «Порівняльне дослідження біологічної дії ендогенних альдегідів як регуляторів метаболізму та чинників його порушень при патологічних станах різного генезу» (2010 – 2014 рр., державний реєстраційний номер 0110U002700) та «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012 – 2016 рр., державний реєстраційний номер 0112U002624).

Наукова новизна одержаних результатів. Автором досліджено процес розвитку оксидативного стресу за показниками стану системи антиоксидантного захисту, рівнем пероксидного окиснення ліпідів та окисного пошкодження протеїнів у щурів за умов аліментарного остеопорозу при недостатній забезпеченості організму вітаміном D₃ та посиленням ендогенним синтезом NO, індукованим додатковим введенням вакцини БЦЖ. Продемонстровано вплив вакцини БЦЖ на перебіг окисних процесів, стан мінерального обміну та кісткової тканини, зокрема її органічного та мінерального компонентів, у щурів з аліментарним остеопорозом. Показано, що після введення вакцини БЦЖ підвищується активність імунокомпетентних клітин крові, змінюється інтенсивність мінерального обміну у напрямку нормалізації та знижується розчинність колагенових молекул кісткової тканини. Такі процеси можуть бути результатом пригнічення резорбції кісткової тканини під дією вакцини БЦЖ та важливого біологічного медіатора NO за умов розвиненої форми аліментарного остеопорозу при недостатньому надходженні в організм вітаміну D₃.

Практичне значення результатів дослідження. Автором розроблено практичні рекомендації по застосуванню спектрофотометричного методу визначення карбонільних груп протеїнів. Запропоновано формулу для розрахунку вмісту карбонільних груп протеїнів, використання якої суттєво знижує похибку результату. Проведені дослідження свідчать про участь вакцини БЦЖ у пригніченні процесів резорбції кісткової тканини за умов аліментарного остеопорозу, викликаного недостатнім забезпеченням організму вітаміном D₃ та є перспективними для пошуку нових шляхів у послабленні перебігу остеопорозу.

Ступінь обґрунтованості та достовірність положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Достовірність результатів та висновків дисертаційної роботи базується на достатній кількості експериментально-біохімічних досліджень. У дисертації Зайцевої О.В. застосовані сучасні біохімічні (спектрофотометрія, хроматографія, радіоізотопний аналіз та ін.), фізико-хімічні (рентгенографія, ЕПР-спектроскопія), остеометричні, імунохімічні (ELISA), методи світлової мікроскопії та протокової цитофлуориметрії, які є адекватними поставленим завданням. На основі чітко сформульованих завдань, використання комплексного методичного підходу дисертанту вдалося досягти поставленої в роботі мети. Усі висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими і доведеними.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. У приведених публікаціях повністю відображено основні результати з усіх розділів дисертації. Автореферат Зайцевої О.В. повністю розкриває зміст дисертації і дає повне уявлення про наукову цінність і практичну значимість дисертаційної роботи. Зміст автореферату ідентичний основним положенням дисертації. Оформлення дисертації та автореферату здійснено у відповідності до вимог ДАК МОН України. Ступінь оприлюднення матеріалів дисертації достатній.

Загальна характеристика дисертації. Дисертація Зайцевої О.В. побудована за загально прийнятою та рекомендованою структурою: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, висновки та список використаних джерел, що налічує 245 найменувань. Дисертація викладена на 136 сторінках друкованого тексту, містить 33 рисунки та 9 таблиць, написана гарною науковою мовою.

У загальній характеристиці роботи автор розкриває суть обраного напрямку наукових досліджень та обґрунтовує його актуальність. Автором сформульовані мета, завдання дослідження, викладені наукове і практичне значення отриманих результатів.

У огляді літератури Зайцева О.В. усебічно охарактеризувала сучасний стан розвитку досліджень із вивчення питань, що стосуються структури та метаболізму кісткової тканини, ролі вітаміну D₃ та оксиду азоту в цих процесах, а також застосування вакцини БЦЖ. Огляд викладено активно, ясно з достатнім проникненням у суть проблеми, добре ілюстрований відповідними схемами і обґрунтовує експериментальну частину дисертації.

В розділі «Матеріали та методи досліджень» докладно описано широке коло методів, які використовував дисертант для вирішення поставлених завдань. В цілому методи підібрані адекватно здійсненню поставленим меті та завданням. Цікавою та корисною є розроблена Зайцевою О.В. модифікація методу визначення вмісту карбонільних груп протеїнів, що дозволяє більш точно оцінити їх вміст в біологічному матеріалі.

Експериментальна частина дисертаційної роботи побудована за єдиною логічною схемою, виконана на високому сучасному науково-методичному рівні.

Автором запропонована модифікація спектрофотометричного методу, яка сприяє покращенню специфічності, підвищенню точності та зменшенню похибки визначення протеїнових СО-груп.

Автором виявлене зростання сумарної активності вітамін D₃ 25-гідроксилази гепатоцитів, що може свідчити про індукбельний характер змін активності мітосомального ізоензиму CYP2R1 через суттєве зниження надходження вітаміну D₃ до організму. Також продемонстровано суттєве зростання інтенсивності утворення активних форм кисню в гепатоцитах щурів з розвиненою формою аліментарного остеопорозу, викликаного D-гіповітамінозом. При цьому показано, що додаткове використання вакцини БЦЖ у тварин з аліментарним остеопорозом призводить до подальшого та більш значного зростання рівня NO, що може мати певний захисний вплив проти руйнації кісткової тканини. Окрім посиленої продукції активних форм кисню і нітрогену індукція окисативного стресу в організмі супроводжується значними змінами у вмісті карбонільованих похідних протеїнів, ТБК-реагуючих продуктів та альдегідів. Автором продемонстровано, що у випадку додаткової індукції нітрозативного стресу на фоні аліментарного остеопорозу після суттєвого підвищення рівня NO відбувається зниження рівня експресії гену iNOS, можливо, за рахунок активації системи негативного зворотного зв'язку високими концентраціями NO. Це призводить до гальмування окисних процесів та активації систем захисту клітин організму від пошкоджуючої дії NO.

Дисертантом також було проведено аналіз амінокислотного складу протеїнів плазми крові після їх кислотного гідролізу. Використання цього методу також певним чином може відображати процес окисного пошкодження протеїнів з утворенням нових, стабільних до кислотного гідролізу амінокислотних модифікацій. В результаті було продемонстровано підвищення вмісту невизначеної амінокислоти з часом елюції 31,06 хв. у щурів з аліментарним остеопорозом, а також додатковим введенням вакцини БЦЖ, яка, на думку автора, може бути результатом утворення постсинтетичних модифікацій у структурі протеїнів, зокрема формування протеїнових карбонільних груп.

Автором було продемонстровано зниження концентрації вільних низькомолекулярних SH-груп і активності ферментних компонентів антиоксидантного захисту гепатоцитів за умов розвитку оксидативного стресу за аліментарного вітамін D₃-дефіцитного остеопорозу.

При оцінці дисертантом функціонального стану фагоцитуючих клітин крові було показано суттєве зниження активності NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази лейкоцитів за аліментарного остеопорозу разом зі зниженням кількості утворення активних форм кисню фагоцитуючими клітинами крові. Додаткове введення вакцини БЦЖ на фоні аліментарного остеопорозу призвело до підвищення активності NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази та інтенсивності утворення активних форм кисню лейкоцитами, що може свідчити про зниження поглинаючої здатності та активності фагоцитуючих клітин периферійної крові разом зі зниженням інтенсивності вільнорадикальних окисних процесів. За цих умов відбувається суттєве пригнічення ефекторної ланки імунітету в реалізації антимікробного захисту. При цьому автор робить висновок, що однією з головних причин виявлених порушень функціонального стану клітин фагоцитарної системи за аліментарного остеопорозу є недостатність вітаміну D₃ в організмі щурів. В той же час під дією вакцини БЦЖ підвищується місцева імунна відповідь, що супроводжується посиленням експресії цитокінів поряд зі збільшенням кількості гранулоцитів і мононуклеарних клітин у тканинах.

При дослідженні мінерального обміну та систем синтезу органічного матриксу було показано, що вакцина БЦЖ та NO, продукція якого значно посилюється у відповідь на її введення, очевидно, являє собою захисний механізм проти кісткової резорбції саме під час патологічного стану.

Разом із викладенням отриманих результатів автор проводить їх узагальнення, аналізує і класифікує за біохімічними механізмами, що є прикладом логічної систематизації та критичного підходу до аналізу власних результатів. Одержані результати стали основою для висновків, які

об'єктивно віддзеркалюють власні спостереження, відповідають меті і завданням дослідження.

Список використаних джерел оформлений у відповідності до сучасних вимог та не викликає зауважень.

Питання та побажання щодо змісту та оформлення дисертації.

Дисертаційна робота справляє позитивне враження – вона викладена доступно, логічно, добре оформлена. Оцінюючи дисертаційне дослідження, впевнено можна сказати, що одержані матеріали мають значне теоретичне та практичне значення.

Під час ознайомлення з роботою виникли деякі питання, на які хотілось би отримати відповідь:

1. До якої вікової групи належать експериментальні тварини, які були використані в роботі? На яку вікову групу пацієнтів можна екстраполювати отримані в роботі дані?
2. Чи були експериментальні тварини, які використовувалися в роботі, статевозрілими та як автор верифікував це?
3. Як, на думку автора, можна пояснити різнонаправлені зміни активності СОД і каталази в крові та тканинах печінки у тварин з остеопорозом та при введенні вакцини БЦЖ?

Проте, як висновок, слід зауважити, що поставлені питання не зменшують значущості даної роботи, яка в цілому, носить закінчений характер.

Відповідність дисертації встановленим вимогам. Висновок.

Дисертаційна робота Зайцевої Ольги Володимирівни «Особливості розвитку і корегування оксидативно-нітрозативного стресу за експериментального остеопорозу», представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є самостійною, завершеною науково-дослідною роботою. Робота має не лише наукове, але й практичне значення, оскільки в ній експериментально обґрунтовано підхід до корекції виявлених порушень.

За актуальністю, новизною отриманих результатів, їх теоретичною та практичною значимістю, глибиною узагальнень та висновків, а також за технічним оформленням представлена дисертаційна робота у повному обсязі відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 року, а її автор, без сумніву, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент -

провідний науковий співробітник

відділу імунології та біохімії

ДУ «Національний науковий центр

«Інститут кардіології ім. М.Д.Стражеска»

НАМН України,

доктор біологічних наук, професор



О.Б. Кучменко

