

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри патофізіології
Полтавського державного медичного університету

Костенко Віталія Олександровича

на дисертаційну роботу Лук'янової Євгенії Михайлівни

на тему: «Роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку

скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу у
щурів»,

яка подана до разової спеціалізованої вченої ради при Харківському
національному медичному університеті МОЗ України

на здобуття ступеня доктора філософії (PhD) в галузі знань «Охорона
здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина», спеціалізація «Патологічна
фізіологія»

Актуальність обраної теми дисертації. Останнім часом все частіше на міжнародних конгресах та конференціях розглядають питання, що стосуються поширення нейродегенеративних захворювань серед людей похилого віку, етіології та профілактики цих захворювань, а також особливостей догляду за такими людьми. Такі захворювання, як судинна деменція та хвороба Альцгеймера (ХА), разом із хворобами серцево-судинної системи та онкологічними захворюваннями, є лідируючими серед причин інвалідизації та смертності серед людей похилого віку в різних країнах, у тому числі й України.

Незважаючи на численні дослідження етіопатогенезу ХА та способів впливу на механізми прогресування хвороби, увага багатьох дослідників зосереджена на вивченні взаємозв'язку між нейропатією та васкулопатією головного мозку. В дисертаційній роботі Лук'янової Є.М. вивчення ролі дисфункції ендотелію судин головного мозку в прогресуванні нейродегенеративних захворювань стало визначальним, так як ендотелій, розташований на базальній мембрані стінки судин, відіграє не тільки бар'єрну функцію між тканиною органів і кров'ю, але й відповідає за зміни проникності судинної стінки, тромбоутворення, тонус судин, ангиогенез, живлення інших шарів судинної стінки. Незворотні зміни у функціональному стані ендотелію судин можуть стати запуском каскаду інших патологічних процесів у тканинах різних органів, у тому числі і тканині головного мозку. Так, багато авторів вважають, що обов'язковим етапом при скупченні амілоїду та формуванні когнітивних порушень є цереброваскулярна дисфункція, що супроводжується розвитком хронічної ішемії та гіпоксії. Можливо, нейродегенерація без попереднього порушення функції ендотелію судин у пацієнтів з ХА не зустрічається.

Існуючі в даний час стратегії терапевтичного впливу при прогресуючих нейродегенеративних захворюваннях включають препарати різних фармакологічних груп, які в більшості випадків не спроможні зупинити прогресування процесу ушкодження мозку. Пошук нових шляхів

корекції даної патології, в тому числі й можливість застосування мезенхімальних стовбурових клітин, спрямованих на відновлення нервових клітин і нейронних зв'язків, є актуальним. Все це обумовлює актуальність обраної теми дисертаційної роботи Лук'янової Євгенії Михайлівни та послужило підставою для виконання дисертації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота Лук'янової Є.М. виконана в межах наукової теми в рамках плану наукових досліджень Харківського національного медичного університету і є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна «Патогенез ушкоджуючої дії на організм екзогенних факторів в сучасних умовах» (№ держ. реєстрації 0115U000991).

Наукова новизна дослідження та отриманих результатів. У процесі наукового дослідження автором було вперше досліджена роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу, викликаній 14- та 28-денним введенням скополаміну бутилброміду.

Вперше був вивчений механізм утворення амілоїду в тканині головного мозку у щурів з 14- та 28-денною нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу, де роль ендотеліальної дисфункції була первинною.

Доповнені наукові дані про те, що фарбування бромфеноловим синім гістологічних зрізів головного мозку можна використовувати для оцінки етапів формування амілоїду та регенераторних процесів в тканині головного мозку під впливом мезенхімальних стовбурових клітин у щурів з двома моделями деменції альцгеймерівського типу.

Науково обґрунтована наявність відновлення капілярів мікроциркуляторного русла головного мозку за рахунок перицитів у щурів, які не отримували стовбурові клітини, а у щурів після введення стовбурових клітин - за рахунок молодих ендотеліоцитів.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Виконана робота є фундаментальним дослідженням. Результати роботи становлять істотний практичний інтерес для нейрофізіології, клінічної неврології, психіатрії, регенераторної медицини, гігієни та екології довкілля.

Вивчений патологічний вплив нітриту натрію на тканину головного мозку дає можливість впровадити ці знання у медичну практику та розробити нові методи профілактики прогресування нейродегенеративних процесів при ХА.

Доказаний факт проникнення скополаміну бутилброміду через гематоенцефалічний бар'єр у щурів після при довготривалого внутрішньоочеревинного введення скополаміну бутилброміду доповнює

інструкцію препарату, де вказано про неможливість цього сполучення проникати через гематоенцефалічний бар'єр.

Розширені уявлення щодо регенераторного потенціалу власних клітин головного мозку з першого дня та після припинення дії ушкоджуючих факторів потребують уваги в практичній медицині.

Отримані в роботі дані стосовно внутрішньовенного застосування мезенхімальних стовбурових клітин з метою лікування ХА, вказують на доцільність подальших поглиблених досліджень для визначення кратності, строків їх введення, побічних ефектів.

Нові, прості за виконанням, морфометричні та гістохімічні методики вивчення функціонування нейропіля та ендотелію судин дають змогу їх використовувати в подальшій практиці гістологів, патоморфологів.

Отримано патент на корисну модель «Спосіб моделювання деменції альцгеймерівського типу судинного походження у щурів». Патент України № 141759. 2020 Квіт 27.

Отримані результати роботи впроваджені в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна, кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету (м. Харків), кафедри патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), кафедри патологічної фізіології Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава), кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету (м. Одеса).

Ступінь обґрунтованості отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дослідження ґрунтується на достатньому за обсягом експериментальному матеріалі (загалом 80 щурів-самців популяції WAG: 64 щура в основних групах та 16 – в групах контролю) з використанням високоінформативних методів дослідження. Достовірність отриманих в дисертації результатів забезпечені вірним методологічним та методичним підходами.

Патофізіологічні, біохімічні, морфологічні, імуногістохімічні, статистичні методики обрані відповідно до логіки дослідження, є сучасними та методологічно обґрунтованими.

Етапи дослідження виконані відповідно загальної ідеї роботи і є послідовними.

Перед початком дослідження визначені критерії включення щурів в дослідження і виключення з нього, задеклароване дотримання біоетичних принципів експериментального дослідження з використанням тварин, що засвідчено відповідними документами комісії з біоетики. Групи спостереження створені адекватно сформульованій меті і завданням у відповідності із вимогами для коректності статистичної обробки результатів дослідження.

Дисертантом проведено статистичну обробку матеріалу на сучасному рівні з використанням непараметричної статистики за допомогою програм GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., Каліфорнія, США) і статистичного пакета для соціальних наук (SSPS).

Таким чином, сучасний методичний рівень роботи, відповідність вибірки критеріям репрезентативності, висока інформативність використаних методів дослідження та адекватність статистичного аналізу дозволяють вважати результати дослідження, наукові положення, висновки і рекомендації достовірними та науково обґрунтованими.

Оцінка змісту, оформлення та обсягу дисертації, зауваження щодо оформлення. Дисертаційна робота Лук'янової Є.М. викладена на 218 сторінках, ілюстрована 31 рисунками та 18 таблицями та побудована відповідно вимогам МОН: складається з анотації, вступу, опису матеріалів і методів дослідження, 2 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, переліку використаних джерел літератури, який містить 287 джерел (з них 44 – кирилицею, 243 – латиницею).

Назва дисертаційної роботи відповідає її змісту. В анотації представлені основні результати дослідження українською та англійською мовами. Сукупність ключових слів відображає тематику дослідження і забезпечує тематичний пошук роботи.

У **вступі** визначено мету, об'єкт і предмет дослідження, наведено актуальність вибраної теми, наукову новизну та практичне значення результатів роботи, зазначені особисті внески здобувачки та інформацію про апробацію дисертації на міжнародних та вітчизняних конференціях, надані положення по структурі та обсязі дисертації.

У **розділі 1** описано дані, що стосуються проблематики ХА або деменції альцгеймерівського типу, сучасні теорії розвитку ХА та принципи лікування, основні моделі відтворення цього захворювання на експериментальних тваринах. Огляд літератури має логічну структуру, змістовний та свідчить про глибоке знання здобувачкою своєї наукової області.

У **розділі 2** структуровано описана схема експерименту; детально викладено методи оцінки поведінкових реакцій та когнітивних функцій у щурів; відображені основні біохімічні методи дослідження стану ендотелію судин, холінергічної, енергетичної, прооксидантно-антиоксидантної систем, рівень гіпоксії в головному мозку щурів; представлені основні гістологічні та імуногістохімічні методи дослідження мікропрепаратів головного мозку; стисло описані методи отримання мезенхімальних стовбурових клітин та статистичні методи обробки результатів дослідження.

У **розділі 3** та **4** представлені основні результати досліджень, де у щурів з двома моделями деменції альцгеймерівського типу в різні строки

експерименту без та після введення мезенхімальних стовбурових клітин були оцінені поведінкові реакції та когнітивні функції. Детально презентовано стан ендотелію судин головного мозку, як з боку біохімічних методів дослідження, так і з боку морфометричних та імуногістохімічних методів дослідження. Додатково описано морфофункціональний стан нейропіля головного мозку, де цікаво описана доцільність застосування різних різних забарвлень гістологічних препаратів. Також додатково проаналізована роль мітохондріальної дисфункції, окислювального стресу, гіпоксії, холінодефіциту в механізмах розвитку експериментальної деменції альцгеймерівського типу.

У **розділі 5** був проведений складний порівняльний аналіз двох моделей деменції альцгеймерівського типу, де ретельно вивчались судинні зміни головного мозку та особливості регенерації клітин судин та нейропіля великих півкуль головного мозку без та після застосування мезенхімальних стовбурових клітин. Результати дослідження співставлені з даними інших авторів, які працюють у даному напрямку досліджень. На основі отриманих результатів запропоновані схеми ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку двох деменцій альцгеймерівського типу та доказана доцільність та ефективність застосування мезенхімальних стовбурових клітин щодо корекції цього стану.

Висновки повністю відповідають отриманим результатам, завданням та меті дисертаційного дослідження.

Практичні рекомендації сформульовані чітко та змістовно, відображають новизну роботи та можуть бути використані як в клінічній практиці, так і в теоретичній медицині.

Таким чином, дисертація Лук'янової Євгенії Михайлівни відповідає існуючим вимогам та є завершеною науковою працею, результати якої вирішують актуальну наукову задачу патологічної фізіології та регенеративної медицини, мають теоретичне і практичне значення.

Повнота оприлюднення наукових положень дисертації. Результати роботи опубліковані в міжнародних журналах, які індексуються наукометричними базами Scopus (2 статті), українських фахових журналах категорії Б (5 статей, з них 1 – одноосібна) та оприлюднені на міжнародних конгресах, конференціях в Україні, Польщі, Болгарії, Данії, Латвії. Отримано 1 патент України на корисну модель.

Особистий внесок здобувачки в одержанні наукових результатів, що виносяться на захист. Здобувачкою особисто визначено мету та завдання дослідження, проведено патентно-інформаційний пошук за темою та аналіз літературних джерел, результати яких свідчать про відсутність аналогів наукових розробок, вибір обсягів та методів досліджень. Здобувачка оволоділа методиками роботи з тваринами та самостійно

проводила моделювання деменції альцгеймерівського типу, оцінювала їх поведінку та пам'ять, внутрішньовенно вводила мезенхімальні стовбурові клітини, проводила морфометрію та статичну обробку отриманих даних.

Аналіз результатів дослідження, їх статистична обробка, оформлення проведені здобувачкою самостійно. Спільно з науковим керівником обговорені та узагальнені наукові положення дисертації, оформлені висновки та практичні рекомендації.

Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності. Рукопис дисертаційної роботи Лук'янової Євгенії Михайлівни перевірено на плагіат програмою Unicheck. Рівень оригінальності тексту є вищим за 88%. За перевіркою посилань комп'ютерною програмою визначено наявність окремих співпадань з власними публікаціями, термінологією, посиланнями на бібліографічні джерела інформації, модифікаціями загальноживаними словосполученнями.

Під час вивчення матеріалів дисертації, аналізу наукових публікацій автора не було виявлено ознак порушення академічної доброчесності, а саме академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації та фальсифікації результатів дослідження.

Таким чином, дисертаційна робота Лук'янової Євгенії Михайлівни визначається самостійною оригінальною працею та не містить порушень академічної доброчесності.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці. Результати дисертаційної роботи мають практичне значення і можуть використовуватися при викладанні курсу патофізіології студентам медичних та фармацевтичних закладів вищої освіти. Отримані дані проведеного наукового дослідження можуть використовуватися в науково-дослідницьких розробках наукових установ, дослідниками при написанні статей та монографій, при плануванні досліджень по даному напрямку, і, отже, можуть в подальшому впроваджуватися в практичну діяльність відповідних лікувально-профілактичних установ.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувачки. Дисертаційна робота Лук'янової Євгенії Михайлівни за змістом та оформленням відповідає існуючим вимогам. Однак дисертантці варто було б звернути увагу на певні недоліки:

1. У розділі 2 «Матеріал та методи дослідження» варто було б вказати, що набори для імуноферментного аналізу (Elabscience, Wuhan, Hubei, China, 2019) для визначення концентрації ендотеліну-1, фактора росту ендотелію судин А (VEGF-A) та ендотеліальної NO-синтази є видоспецифічними саме для щурів (Rat ELISA Kits), а також бажано вказувати довжину хвилі, на якій визначалася абсорбція.

2. У розділі 5 «Аналіз та узагальнення результатів» авторка робить припущення, що «посилення окислювальної модифікації білків у

нейропилі великих півкуль у щурів із нітритною моделлю виникло внаслідок метгемоглобінемії та гіпоксії тканини ГМ», але безпосередньо факт метгемоглобінемії при введенні різних доз нітриту натрію дисертанткою не був доведений, оскільки рівень метгемоглобіну в крові щурів не визначався.

3. Некоректним вважаю такі вирази, як «статистично недостовірне зниження» (с. 98), або «недостовірно більше, ніж у групі контролю» (с. 112), оскільки перевищення ймовірності похибки (P) $> 0,05$ підтверджує нульову статистичну гіпотезу про тотожність величин, тобто значення не зазнають змін.

4. Зустрічаються поодинокі граматичні та стилістичні помилки.

Усі наведені зауваження носять рекомендаційний і дискусійний характер і не зменшують наукової новизни, теоретичного і практичного значення отриманих авторкою результатів.

У ході рецензування дисертаційної роботи виникли запитання для дискусії:

1. Чому Ви вирішили використовувати саме нітрит натрію для відтворення моделі деменції альцгеймерівського типу? Чому Ви обрали для «періоду регенерації» саме 14 днів, а не, наприклад, 7 днів або 21 день?

2. Взагалі ендотеліальна дисфункція супроводжується зменшення активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази (eNOS). Але Ви за умов введення скополаміну бутилброміду та водного розчину нітриту натрію виявили підвищення вмісту eNOS в сироватці крові. Чи можливо цей факт пов'язувати з ушкодженням ендотелію?

3. Як указано в 7-му висновку застосування мезенхімальних стовбурових клітин призводить до зниження рівня eNOS в сироватці крові у щурів з нітритною моделлю, що Ви пов'яжете з відновленням ендотелію судин. Водночас мезенхімальні стовбурові клітини підвищують eNOS у щурів зі скополаміновою моделлю, що, за Вашим твердженням, є результатом відновлення ендотелію судин та функції холінергічної системи. Як можна розцінювати ці факти – як позитивні ефекти застосування мезенхімальних стовбурових клітин, або як їхню побічну дію?

Відповідність роботи вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора філософії.

Дисертаційна робота Лук'янової Євгенії Михайлівни на тему «Роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу у щурів», яка представлена на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина», є закінченою самостійною кваліфікаційною науково-дослідною роботою.

У роботі наведено теоретичне обґрунтування й нове вирішення наукового завдання, яке полягає у визначенні ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 08:39:21 10.05.2023

Назва файлу з підписом: відгук1 Костенко В.О.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 636.8 КБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: відгук1 Костенко В.О.pdf
Розмір файлу без підпису: 656.0 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: КОСТЕНКО ВІТАЛІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ
П.І.Б.: КОСТЕНКО ВІТАЛІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ
Країна: Україна
РНОКПП: 2452004638
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 08:39:19
10.05.2023
Сертифікат виданий: АЦСК АТ КБ «ПРИВАТБАНК»
Серійний номер: 248197DDFAB977E504000000826FF2004EDA2004
Алгоритм підпису: ДСТУ-4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)
Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)
Сертифікат: Кваліфікований