

РЕЦЕНЗІЯ

рецензента, доктора медичних наук, завідувачки кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ України, професорки **Наконечної Оксани Анатоліївни** на дисертаційну роботу аспірантки кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна Харківського національного медичного університету **Лук'янової Євгенії Михайлівни** на тему **“Роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу у щурів”**, подану до захисту на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина», спеціалізація «Патологічна фізіологія»

1.Актуальність теми дисертації

В останні роки увага багатьох дослідників спрямована на вивчення взаємозв'язку між нейропатією та васкулопатією в головному мозку, адже роль судинних факторів у механізмах пошкодження функції нейронів при нейродегенеративних захворюваннях, зокрема хворобі Альцгеймера, є визначальною. Деякі автори вважають, що обов'язковим етапом при накопиченні амілоїду та формуванні когнітивних порушень є цереброваскулярна дисфункція, що обумовлена ушкодженням судин та розвитком хронічної ішемії. Можливо, нейродегенерація без попереднього порушення функції ендотелію у хворих на хворобу Альцгеймера (ХА) або первинна дегенеративна деменція альцгеймерівського типу не зустрічається. З іншої сторони, це може бути результатом поєданого, негативного впливу різних за своєю природою екзогенних факторів, які здатні викликати генетичні мутації в організмі людини, а надалі призводити і до розвитку нейродегенеративних процесів.

Вивчення етіопатогенезу ХА залишається актуальним питанням, що пов'язано з необхідністю пошуку нових ефективних засобів боротьби з прогресуванням цієї патології. На сучасному рівні розвитку науки продовжується пошук оптимального патогенетичного підходу до лікування пацієнтів із ХА. 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.

Відомо, що для лікування деяких судинних хвороб, нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Паркінсона, розсіяний склероз останнім часом в світі успішно застосовують мезенхімальні стовбурові клітини (MSC) з червоного кісткового мозку. Однак проблема застосування стовбурових клітин для запобігання прогресування та лікування ХА на теперішній час досі вивчається.

Таким чином, потребують уточнення питання етіопатогенезу ХА, необхідним є подальший пошук закономірностей перебігу захворювання, вивчення ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу в експериментальних умовах, а також можливість корекції даного стану за допомогою MSC.

З огляду на вищевикладене, дисертаційну роботу Лук'янової Євгенії Михайлівни, що виконана під науковим керівництвом д.мед.н., професора кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна Харківського національного медичного університету Павлової Олени Олексіївни, слід вважати актуальною в науковому, теоретичному та практичному аспектах та такою, що вирішує важливе медико-соціальне завдання сучасної патофізіології, нейрофізіології, неврології, психіатрії та регенеративної медицини.

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

Робота Лук'янової Євгенії Михайлівни була виконана в рамках плану наукових досліджень Харківського національного медичного університету і є частиною науково-дослідної роботи кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна «Патогенез ушкоджуючої дії на організм екзогенних факторів в сучасних умовах», № державної реєстрації 0115U000991.

3.Оцінка наукового рівня дисертації та наукових публікацій здобувача

Дисертаційна робота має безсумнівну наукову новизну. Зокрема, автором вперше було виявлені більш виражені морфофункціональні ознаки ушкодження ендотелію судин у щурів з нітритною моделлю деменції альцгеймерівського типу. Автором вперше за даними змін рівнів eNOS, ET-1, VEGF-A в сироватці та vWF в плазмі крові встановлено, що від тривалості введення скополаміну бутилброміду та нітриту натрію залежить прогресування ступеня пошкодження ендотелію судин. Дисертантом на підставі визначення ступеня гіпоксії, холінодефіциту, стану енергетичного стану клітинних мембран та активності ферментів антиоксидантної системи в гомогенатах головного мозку щурів простежена схожа закономірність у спрямованості відхилень від контролю, при чому більш виражені відхилення автор спостерігав у тварин з нітрит-індукованою моделлю.

Вперше автором було оцінено функціональний стан нейропіля великих півкуль головного мозку щурів і визначено, що введення саме скополаміну бутилброміду призводить до більш суттєвого зниження його функціональної активності. Дисертант спостерігав порушення поведінкових реакцій у щурів всіх груп. Автором визначено, що втрата когнітивних функцій була більш вираженою у щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу.

Дисертантка вперше довела, що одноразове внутрішньовенне введення MSC, отриманих з червоного кісткового мозку, в порівнянні з щурами, які не отримували MSC, сприяє росту нових капілярів, регенерації нервових відростків, нормалізації рівня ацетилхоліну та покращенню когнітивних функцій у щурів з двома експериментальними моделями різної тривалості.

Дисертанткою доповнені наукові дані про роль ендотеліальної дисфункції в патогенезі нейродегенеративних процесів в головному мозку, розширені уявлення про регенераторний потенціал клітин головного мозку

на тлі введення скополаміну бутилброміду та нітриту натрію та після припинення їх негативного впливу.

Аналіз дисертаційної роботи свідчить, що автором використано власні наукові публікації, у тому числі, написані у співавторстві. В кожній науковій праці, опублікованій у співавторстві, чітко зазначений внесок дисертанта.

За темою дисертаційного дослідження надруковано **21 наукову працю**, з яких 5 статей в наукових фахових виданнях України, рекомендованих МОН України, 2 статті – в зарубіжних виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus, 14 тез у збірниках матеріалів міжнародних наукових конференцій, конгресів (Польща, Болгарія, Данія, Україна, Латвія). **Дисертантом отримано патент України на корисну модель.**

4. Новизна представлених експериментальних результатів виконаних здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях

Наукова новизна полягає в тому, що вперше за даними комплексного та порівняльного аналізу на експериментальних двох моделях деменції альцгеймерівського типу були показані етапи амілоїдозу головного мозку, де ендотеліальна дисфункція судин головного мозку мала різне місце. Вперше завдяки зміні тривалості введення скополаміну бутилброміду та нітриту натрію були вивчені особливості поведінкових реакцій та когнітивних функцій та відповідно ступінь холінодефіциту, дисфункції ендотелію судин, гіпоксії, дисбалансу в енергетичній та прооксидантно-антиоксидантній системі, пошкодження нейропіля білої речовини великих півкуль головному мозку щурів.

Результати дисертаційного дослідження були представлені дисертантом у вигляді доповідей на фахових наукових конференціях та міжнародних конгресах в Данії, Болгарії, Латвії, Польщі та в Україні. В публікаціях повністю відображені всі завдання дисертаційної роботи та їх вирішення.

Таким чином, дисертаційне дослідження, виконане Лук'яною Євгенією Михайлівною, повністю викладено в опублікованих працях, має високий рівень новизни та відповідає всім вимогам положення на здобуття наукового ступеню доктора філософії.

5. Наукова обґрунтованість отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота Лук'янової Євгенії Михайлівни є закінченим науковим дослідженням, яке виконано на сучасному методичному рівні. Зміст дисертаційної роботи побудований на відповідному первинному матеріалі. Сформульовані автором основні наукові положення, висновки і рекомендації зроблені на підставі результатів, отриманих у дослідженнях на достатній кількості спостережень: 80 щурів - самців популяції WAG згідно завданням наукового дослідження та сучасним поглядам біоетики щодо експериментальних досліджень. Дисертантом використані сучасні патофізіологічні, біохімічні, морфологічні, імуногістохімічні, аналітико-статистичні методи обстеження.

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації базуються на матеріалах власних досліджень автора, логічно витікають з матеріалів дисертації і є науково обґрунтованими, чітко сформульованими та містять нові важливі науково-практичні узагальнення.

6. Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, виконаним під керівництвом д.мед.н., проф. Павлової О.О. на базі Харківського національного медичного університету. Автором самостійно проаналізовано дані наукової літератури, визначено мету і завдання дисертаційного дослідження, розроблено дизайн експерименту. Дисертантка самостійно повністю провела експеримент: виконала внутрішньоочеревинні ін'єкції скополаміну бутилброміду, нітриту натрію та фізіологічного розчину різним

групам щурів впродовж 14 та 28 днів, одноразові ін'єкції MSC в хвостову вену, провела оцінку поведінкових реакцій та когнітивних функцій у всіх щурів відповідними методами до початку експерименту, після останньої ін'єкції препаратів та через 2 тижня «періоду регенерації», провела забір біологічного матеріалу та з співробітниками центральної наукової лабораторії ХНМУ виконала біохімічне та морфологічне дослідження. Здобувачка виконала статистичну обробку отриманих даних та провела глибокий їх аналіз. Дисертантом спільно з керівником сформульовано основні наукові положення, що внесені до захисту, зроблені висновки та практичні рекомендації. Лук'янова Є.М. оволоділа навичками написання статей в міжнародних журналах та українських фахових журналах. Активно висвітлювала результати дисертаційного дослідження в Україні та за кордоном. Автором за отриманими результатами підготовлено пакет документів для оформлення патенту України на корисну модель.

7. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Отримані результати розкривають вплив нітриту натрію на головний мозок тварин, що дає можливість впровадити ці знання у медичну практику та харчову промисловість з метою зменшення використання цієї речовини. Вивчений патогенез ХА у щурів, де особливу увагу звертали на дисфункцію ендотелію судин, дає можливість поглибити ці знання та розробити нові схеми лікування пацієнтів на ХА. Позитивний ефект від внутрішньовенного використання MSC, отриманих з червоного кісткового мозку, сприяє подальшому вивченню цього метода корекції нейродегенеративних станів в експериментальних умовах з подальшим впровадженням в клінічну медицину. Звертає увагу підтвердження факту наявності регенераторного потенціалу клітин судин головного мозку.

Автором розроблені акти впровадження 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).

8. Обсяг та структура дисертації

Дисертаційна робота Лук'янової Є.М. побудована за класичним типом, викладена українською мовою на 218 сторінках машинописного тексту та 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), що займають 36 сторінок, та додатків (на 16 сторінках). Робота ілюстрована 18 таблицями і 31 рисунками, які займають 45 сторінок.

Оформлення та структура представленої дисертації в цілому відповідають чинним вимогам МОН до дисертацій. Стиль описання результатів досліджень, наукових положень та висновків забезпечує доступність сприйняття роботи. Технічне оформлення дисертації якісне.

У **вступі** автором наведена актуальність проблеми, що вирішується, обґрунтовано вибір теми 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 **першому розділі (огляд літератури)** автор проводить аналіз сучасної наукової літератури за напрямом дисертаційної роботи, розкриває етіологічні фактори ризику та основні ланки патогенезу ХА. У цьому розділі

дисертантка детально розглядає теорію «амілоїдного каскаду» та «амілоїдної дисфункції», гіпотези: таупатії, дисфункції нейротрансмісії та холінергічну гіпотезу, мітохондріального каскаду та окислювального стресу, нейрозапалення та дисфункції мікроглії, судинну гіпотезу. Автором детально розглянуті основні групи експериментальних моделей деменції альцгеймерівського типу. Здобувачем проведено науковий аналіз літератури щодо перспективності і обхвату патогенетичних ланок терапії деменції альцгеймерівського типу стовбуровими клітинами, а саме MSC з червоного кісткового мозку, введеними внутрішньовенно.

У розділі 2 «Матеріали, моделі та методи дослідження» визначено програму дослідження, обґрунтовано вибір та напрямок дослідження. Автором визначено основні групи експериментальних тварин (експеримент проводили за участю 80 щурів-самців популяції WAG) та моделі: в експерименті були використані дві нетрансгенні моделі деменції альцгеймерівського типу: скополамін-індукована (холінодефіцитина) та нітритіндукована (судинного походження). Автором застосовані сучасні патофізіологічні, біохімічні, морфологічні, імуногістохімічні, аналітико-статистичні методи. Обрані дисертантом методи статистичної обробки одержаних результатів є адекватними і дозволяють вирішити завдання дослідження. Автор проводив оцінювання нормальності розподілу вибірки за допомогою тесту Шапіро-Уїлкі. Для оцінювання відмінностей між п'ятьма та більше незалежними групами в дослідженні автором був обраний односторонній дисперсійний аналіз Краскела-Уолліса і тест множинних порівнянь Данна. Розроблений здобувачем дизайн досліджень забезпечив вирішення поставлених завдань та досягнення мети роботи.

У розділі 3 «Результати власних досліджень. Скополамін - індукована модель деменції альцгеймерівського типу» автором показано різні поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів групи контролю та зі скополаміновою моделлю. Дисертантом в цьому розділі наведено біохімічні

показники функції ендотелію судин, прооксидантно-антиоксидантної системи, енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну в тканині головного мозку у щурів. Автором досліджено морфофункціональні зміни в тканині головного мозку у щурів. Проведені дослідження засвідчили, що використання ін'єкції MSC веде до покращення морфофункціонального стану судин МЦР із можливою внутрішньоклітинною регенерацією у відростках нервових клітин

У розділі 4 «Результати власних досліджень. Нітрит-індукована модель деменції альцгеймеровського типу» автором показано поведінкові реакції та когнітивні функції у експериментальних тварин. Автором визначено, що у щурів дослідних груп введення нітриту натрію впродовж 14 днів викликає достовірні зміни показників крові, що відображають функції ендотелію судин та показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи в гомогенатах головного мозку; Автором показано, що з продовженням тривалості введення цього розчину біохімічні параметри в більшій мірі відрізняються від групи контролю. Автор робить висновок, що зі збільшенням тривалості введення нітриту натрію в тканині головного мозку зменшується кількість VEGF та збільшується його використання клітинами ГМ, а після введення стовбурових клітин динаміка змін оптичної щільності міченої VEGF плазми набуває такого ж характеру, як і зміни в мічених ендотеліоцитах і нейронах гіпокампа.

У розділі 5 «Аналіз та узагальнення результатів» автором було показано, що тривале введення нітриту натрію та скополаміну бутилброміду веде до розвитку деменції альцгеймерівського типу. Було висвітлено, що когнітивні та поведінкові зміни спостерігаються у тварин з обома 14 - денними моделями захворювання та прогресують із двократним збільшенням тривалості ушкоджуючої дії. Дисертантом визначено, що в обох моделях із різними механізмами розвитку когнітивного дефіциту як субендотеліально, так і в тканині ГМ формується амілоїд. Роль судинного ушкодження у

механізмах розвитку ХА та формуванні амілоїду була розглянута з різних сторін. Здобувач визначає регенерацію судин як за рахунок перицитів за типом субституції самостійно, так і за рахунок молодих ендотеліоцитів за типом реституції після внутрішньовенного введення MSC. За думкою автора, використання ін'єкції MSC веде до можливої внутрішньоклітинної регенерації у відростках нервових клітин.

Висновки є ґрунтовними, витікають з результатів проведеного дослідження, мають наукову новизну.

9.Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці

Згідно з результатами дисертаційної роботи, у людей з факторами ризику серцево-судинних захворювань слід вивчати структуру білої речовини головного мозку за допомогою інструментальних досліджень, тому що амілоїдне ураження дрібних судин призводить до гіперперфузії білої речовини головного мозку, що може бути зафіксовано до появи симптомів деменції. При морфологічному дослідженні тканини головного мозку в практиці гістолога можна використовувати забарвлення бромфеноловим синім для розуміння стадій амілоїдогенезу різних структур головного мозку.

При внутрішньовенному введенні MSC слід враховувати особливості їх міграції та терміни їх введення. Хронічне нітритне та нітратне навантаження, з яким стикається кожен з нас в харчуванні, промисловості, навколишньому середовищі, є небезпечним для наших судин та органів, в тому числі й для головного мозку. Треба приділяти більш уваги складу продуктів харчування, воді при споживанні, бо довготривалий вплив нітратів та нітритів, які потрапляють до нашого організму, може викликати ХА та, скоріш за все, інші нейродегенеративні захворювання, що треба досліджувати далі.

10. Відсутність порушень академічної доброчесності

Після перевірки дисертаційної роботи Лук'янової Євгенії Михайлівни

було встановлено, що коефіцієнт оригінальності становить вище 70% (за інтернет-системою Unicheck.com). Таким чином, в даній роботі відсутні порушення академічної доброчесності.

11. Недоліки дисертації щодо їх змісту і оформлення

Дисертаційна робота написана достатньо повно, науковою мовою, і оформлена згідно вимог ДАК МОН України. Суттєвих зауважень щодо оформлення дисертаційної роботи немає. Позитивно оцінюючи дисертацію Є.М. Лук'янової у цілому, слід зазначити, що в процесі рецензування роботи виникли деякі зауваження, запитання або дискусійні моменти.

У тексті зустрічаються поодинокі граматичні помилки, некоректні терміни та скорочення. Дуже обширний список використаних скорочень (2 стор.). Було б доцільним в визначені значення отриманих результатів (науковому або практичному) додати відомості про отриманий патент України на корисну модель. У предмет дослідження було б доцільним додати не тільки ендотеліальну дисфункцію, а й оксидантно-антиоксидантну систему, ступінь гіпоксії. У розділі 2 здобувач не вказує який корм вживали експериментальні тварини. Також необхідно зазначити як отримували сироватку, плазму та еритроцити. Не згодна з нумерацією таблиць та рисунків. Два рази повторюється назва рисунків.

Ряд зауважень і пропозицій були обговорені з дисертантом, були взяті до уваги та опрацьовані. Поряд з цим виникло ряд питань, які мають дискусійний характер і не впливають на загальний позитивний погляд на дисертаційну роботу.

1. Чому після введення MSC у щурів з нітратною моделлю рівень ендотеліальної NO- синтази в сироватці крові щурів зменшується, а у щурів зі скополаміною моделлю навпаки збільшується?

2. Чому в нітрітній моделі Ви використовували саме дозу 50 мг/кг нітриту натрію?

3. Чому для експерименту Ви брали саме щурів - самців?

12. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Лук'янової Євгенії Михайлівни «Роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу у щурів» є закінченим самостійним науковим дослідженням, в якому отримані нові результати, що в сукупності вирішують наукове завдання патофізіології та нейрофізіології – визначення ролі дисфункції ендотелію в амілоїдогенезі головного мозку при різних експериментальних моделях ХА в різні періоди та можливість застосування внутрішньовенного введення стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку.

Дисертаційна робота Лук'янової Євгенії Михайлівни за актуальністю, обсягом і рівнем проведених досліджень, науковою новизною і практичною значимістю відповідає вимогам до дисертації доктора філософії, що зазначені у «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінетів Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року та Вимогам до оформлення дисертації відповідно до наказу МОН України №40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

Рецензент:

завідувачка кафедри біологічної хімії

Харківського національного медичного університету

доктор медичних наук, професорка



О.А. Наконечна

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 10:38:01 10.05.2023

Назва файлу з підписом: Рецензія_Наконечна О.А._Лук'янова Є.М. (1) (1).pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 2.6 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Рецензія_Наконечна О.А._Лук'янова Є.М. (1) (1).pdf
Розмір файлу без підпису: 3.0 МБ

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

Підписувач: НАКОНЕЧНА ОКСАНА АНАТОЛІЇВНА

П.І.Б.: НАКОНЕЧНА ОКСАНА АНАТОЛІЇВНА

Країна: Україна

РНОКПП: 2540301042

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 10:37:58
10.05.2023

Сертифікат виданий: АЦСК АТ КБ «ПРИВАТБАНК»

Серійний номер: 2B6C7DF9A3891DA10400000FB47C00085506B03

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