

В І Д Г У К

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача відділу клінічної фізіології та генетики ДУ «ННЦ «Інститут кардіології імені акад. М.Д.Стражеска» НАМН України Талаєвої Тетяни Володимирівни на дисертаційну роботу Гончарова Сергія Вікторовича «Молекулярно-генетичні механізми порушення протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та підходи до її корекції», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія в спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України.

Актуальність теми дисертації

Артеріальна гіпертензія (АГ) є однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем, зважаючи на її поширеність та частоту серцево-судинних ускладнень. В 2017 році (за даними Коваленко В.М. та співавт., 2017) в Україні зареєстровано 10,357 млн хворих на АГ, а частота мозкового інсульту та смертності від нього є найвищими в Європейському регіоні, що, перш за все, зумовлено низьким відсотком ефективного контролю артеріального тиску (АТ) на популяційному рівні.

АГ, так само як і гіперхолестеринемія (ГХЕ) та куріння, відноситься до числа найважливіших факторів ризику розвитку атеросклерозу та ішемічної хвороби серця (ІХС). Встановлено, що розповсюдженість ІХС, тяжкість її клінічного перебігу, частота розвитку основних кінцевих точок типу інфаркту міокарда (ІМ), інсульту, серцевої недостатності та кардіальної смерті у осіб з АГ більше у 2-3 рази у порівнянні з особами без ознак підвищення АТ (Pioli M., 2017; Robert M., 2018; Williams B., 2018).

Незважаючи на те, що на клінічному рівні картина АГ представляється досить однорідною, причини її розвитку та патогенез є гетерогенними і включають поєднання різних генетичних, біохімічних та фізіологічних факторів, які до сьогодення ще повністю не встановлені.

Залишається дискусійним питання, наскільки ураження органів-мішеней, перш за все, ремоделювання серця та судин при АГ є прямим наслідком підвищеного артеріального тиску (АТ). В ряді експериментальних досліджень на спонтанно гіпертензивних щурах (СГЩ) показано, що ремоделювання серця та

судин виникає раніше, ніж підвищується рівень АТ. Інфузія А II в субпорогових концентраціях, яка не викликала судинні реакції та підвищення АТ, супроводжувалась розвитком структурних змін, які приводили до ремоделювання серця, судин, нефросклерозу внаслідок активації тканинних РАС. Ці дані свідчать про те, що подібні порушення не є тільки наслідком підвищеного АТ і можуть виникати незалежно від нього.

Дане положення підтверджено результатами Framingham Heart Study, популяційного дослідження CAFÉ (Conduit Artery Functional End Point), в яких тяжкість перебігу гіпертонічної хвороби, частота розвитку ІХС та її кінцевих точок корелювали з величиною пульсового, але не середнього АТ. Проте залежність визначається, скоріш за все, не величиною пульсового тиску, пік якого не перевищує рівень САТ, а тим, що його зростання є наслідком підвищення жорсткості стінки артерій в результаті розвитку в ній запалення та метаболічних порушень, що мають самостійну проатерогенну дію.

Неодноразово показано, що гіпертонічна хвороба поєднується з розвитком хронічного запалення як системного, так і локального, безпосередньо у міокарді і в судинній стенці, і у гіпертензивних пацієнтів відмічається підвищений рівень прозапальних цитокінів - фактора некроза пухлин α (ФНО- α), інтерлейкіна-6 (ІЛ-6) у тканинах і плазмі та С-реактивного протеїна (СРП) (Miguel C.D., 2015; Barrows I.R., 2019). Багатофакторний регресійний аналіз даних, отриманих при дослідженні пацієнтів з АГ, дозволив встановити наявність незалежного зв'язку між пульсовим АТ, вмістом СРП та сумарною товщиною комплексу інтима-медіа сонної артерії як маркера початкового атеросклерозу.

Крім того, незважаючи на останні досягнення у лікуванні хворих з АГ, у 10-15% хворих на АГ, навіть за умов застосування трьох і більше антигіпертензивних препаратів, не вдається досягти цільового АТ, а ризик виникнення серцево-судинних ускладнень (інфаркту міокарда, мозкового інсульту) хронічної хвороби нирок та смерті у таких пацієнтів у 2-6 разів вищий порівняно з пацієнтами, АГ яких піддається лікуванню.

Все це робить повністю обумовленою спробу автора визначити етіологічні та патогенетичні механізми розвитку АГ, а саме – ролі протеасомного протеолізу у розвитку АГ з визначенням генетичної схильності на тваринній моделі з підтвердженням отриманих результатів у клініці у підлітків з есенціальною АГ, з подальшим визначенням шляхів фармакологічної корекції із застосуванням інгібітора протесомної активності. Вирішенню цих важливих питань і була присвячена робота, що представлена до захисту, і це свідчить про актуальність проведеного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами

Дисертаційна робота Гончарова Сергія Вікторовича виконувалася відповідно до основного плану наукової тематики відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: “Вивчення молекулярно-генетичних механізмів розвитку ішемії-реперфузії та розробка нових методів генотерапії інфаркту міокарда”, № державної реєстрації 0107U005336, «Дослідження ендогенних, молекулярно-генетичних механізмів ушкодження та цитопротекції при ішемічній патології», № держреєстрації 0107U005323, «Вивчення механізмів розвитку серцево-судинної патології за допомогою багаторівневих досліджень: від поліморфізму та експресії генів до патофізіологічних проявів», № держреєстрації 0107U005336, в яких дисертант був співвиконавцем.

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність і новизна

Дисертаційну роботу Гончарова Сергія Вікторовича характеризує великий обсяг проведеного клініко-експериментального дослідження. Клінічна частина дослідження включала обстеження 147 підлітків з діагнозом есенціальна АГ та контрольну групу склали 208 школярів відповідного віку з нормальним АТ. Визначали розподіл алельних варіантів генів PSMA6, LMP2, LMP7 у підлітків з есенціальною АГ у порівнянні з підлітками, що входили до контрольної групи з нормальним рівнем АТ.

Пошукачем проведено експериментальний фрагмент роботи на 6-місячних нормотензивних щурах лінії Wistar та щурах з генетично детермінованою АГ (SHR), частина яких отримувала таблетовану форму кверцитину («Квертин») протягом 8-ми тижнів. Для вирішення поставлених завдань автором був використаний комплекс сучасних методичних підходів. Для визначення функціонально-структурних змін серця реєстрували основні показники кардіогемодинаміки за допомогою мікрокатетерів SRP-838 (Millar Instruments, Houston, TX). Дисертант визначав показники обміну ліпідів та ліпопротеїнів крові у тварин контрольної та досліджуваних груп, досліджувалися морфологічні зміни аорти та серця у гіпертензивних щурів порівняно з нормотензивними. На основі отриманих результатів оцінювалася можливість попередження ураження органів мішеней (серця та судинної стінки) за допомогою експериментального лікування із застосуванням інгібітору активності протеасом кверцитину.

Проведене дослідження включало визначення рівнів експресії мРНК генів, що кодують конститутивні, індукцйбельні та регуляторні субодиниці протеасом у тканинах аорти у СГЩ у порівнянні з нормотензивними щурами та можливість впливу на дані процеси експериментального лікування із застосуванням інгібітору активності протеасом кверцитину. У тканинах серця СГЩ визначали рівень експресії генів, що визначають активність протеасомного протеолізу (PSMB1, PSMB2, PSMB9, PSMC1, PSME1), у порівнянні з нормотензивними щурами та можливість впливу на дані процеси лікування із застосуванням кверцитину. Велика увага приділялась визначенню протеасомної активності: трипсино-, химо трипсиноподібній та пептидилглютаміл пептидгідролазній активності протеасом у тканинах аорти піддослідних щурів.

Отримані дані обробляли статистично з використанням програми MS Excell 2010, SPSS Statistics 18.0, Plotus 0.2. Проводили регресійно-кореляційний аналіз отриманих даних. Результати міжгрупових порівнянь вважали статистично достовірними за умови ($P < 0,05$).

Достатньо великий обсяг проведеного дослідження, застосування сучасних стандартизованих методів, математичного статистичного аналізу отрима-

них даних свідчать про достовірність та достатню обґрунтованість основних положень роботи. Висновки, сформульовані автором, відповідають основним положенням дисертації і впливають із отриманих автором даних та їх аналізу.

Наукова новизна результатів досліджень

Для вирішення поставлених завдань автором був використаний комплекс сучасних методичних підходів, що дозволило детально та всебічно оцінити значимість протеасомного протеолізу у розвитку артеріальної гіпертензії з визначенням генетичної схильності, зміни експресії генів, що визначають дані зміни, активності протеолітичного комплексу та на основі отриманих даних запропонувати метод фармакологічної корекції виявлених порушень із застосуванням інгібітора протеасомної активності.

Основним результатом проведеного дослідження є встановлення особливостей розподілу різних алельних варіантів промотору гену PSMA6 та генів, що кодують одиниці імунопротеасоми (LMP2, LMP7) у підлітків з есенціальною АГ у порівнянні з підлітками з нормальним АТ.

На експериментальній моделі АГ у СГЩ встановлено, що у патогенезі АГ мають значення експресія генів, що кодують субодиниці протеасоми, що призводить до зміни протеасомної активності і лежить в основі як підвищення АТ, так і ушкодження органів мішеней – у розвитку структурно-функціональних змін судинної стінки та міокарду в умовах артеріальної гіпертензії, а також можливість їх корекції за допомогою експериментального лікування із застосуванням інгібітору активності протеасом кверцетину.

Одним з найбільш значущих фрагментів роботи є підтвердження сучасних уявлень, що патогенез гіпертонічної хвороби не обмежується тільки підвищенням артеріального тиску, а включає також ремоделювання серця та стінки артеріальних судин, суттєву роль у чому грає активація протеасомного протеолізу.

Практичне значення результатів дослідження

Практичне значення роботи полягає, перш за все, в тому, що в клінічному фрагменті доведена значимість генетичних чинників, що кодують субодиниці протеасоми у розвитку есенціальної АГ та обґрунтувати необхідність генотипування цих сайтів для визначення ризику розвитку АГ у підлітковому віці та у хворих з резистентною АГ.

Практичне значення дисертації полягає також у тому, що при обстеженні та лікуванні хворих на гіпертонічну хворобу треба приділяти увагу не тільки рівню артеріального тиску, але й визначенню структурно-функціональних змін міокарду та своєчасній їх корекції. Отримані у проведеній роботі результати мають суттєве значення для розробки цілеспрямованих шляхів профілактики та лікування структурно-функціональних порушень міокарду та стінки артеріальних судин при артеріальній гіпертензії. Встановлена в дисертації значимість змін протеолітичної активності у розвитку структурно-функціональних порушень міокарду та стінки артеріальних судин при артеріальній гіпертензії вказує на те, що однією з можливих мішеней фармакологічних втручань може бути пригнічення активності протеасом за допомогою кверцетину.

Дані, отримані в дисертаційній роботі, суттєво розширюють сучасні уявлення про патогенез АГ. Одержані результати можуть бути використані при викладанні курсу внутрішніх хвороб, кардіології та патофізіології у медичних університетах.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота Гончарова Сергія Вікторовича побудована за традиційною схемою, складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, розділу аналізу і узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних літературних джерел. Дисертація викладена на 162 сторінках друкованого тексту. Робота ілюстрована 43 рисунками. Список використаних літературних джерел включає 91 найменування, з них 3 - кирилицею, 88 - латиницею.

Характеристика змісту окремих розділів дисертації

У вступі дисертації обґрунтовані актуальність, мета і завдання роботи, визначена наукова і практична її значимість, особистий внесок здобувача.

Огляд літератури «Роль протеасомного протеолізу в клітинах судинної стінки в нормі та при артеріальній гіпертензії» свідчить про обізнаність автора щодо значимості артеріальної гіпертензії як фактору кардіоваскулярного ризику. Автор досить компетентно на основі новітніх літературних посилань висвітлює роль зміни протеолітичної активності протеасоми у регуляції функціонального стану судин та серця, значимість експресії генів, що кодують субодиниці протеасоми у підвищенні артеріального тиску.

При формуванні робочої гіпотези автор базувався на тому, що зміни протеолітичної активності протеасоми призводять до активації локального запалення в судинній стінці, що лежить в основі порушення функціональних властивостей ендотелію, зменшенні продукції вазодилатуючих речовин, збільшення продукції вазоконстрикторів, активує процеси розвитку як атеросклерозу, так і артеріосклерозу. Всі ці процеси призводять до підвищення АТ. Зміни протеолітичної активності лежать в основі порушення структурно-функціональних змін і в міокарді.

У розділі 2 «Матеріал і методи дослідження» надана детальна характеристика досліджуваних тварин, групи пацієнтів, що були включені у дослідження т практично здорових осіб, методів оцінки показників кардіодинаміки, дослідження морфологічних змін аорти та міокарду, визначення рівнів експресії генів, що кодують субодиниці протеасоми, рівні експресії мРНК, що кодують конститутивні індукцибельні та регуляторні субодиниці протеасом; визначення активності протеолітичного комплексу. Автором ґрунтовно описані всі методи, а також метод статистичного аналізу, що дає підстави вважати використані в дисертаційній роботі методи сучасними і високоінформативними.

У розділі 3 «Дослідження частоти алельного поліморфізму генів, що кодують різні субодиниці протеасоми у дітей з первинною артеріальною гіпертензією» автор доводить, що у підлітків з есенціальною АГ у порівнянні з підлітками з нормальним АТ встановлені особливості розподілу різних алельних ва-

ріантів промотору гену PSMA6 та генів, що кодують одиниці імунопротеасоми (LMP2, LMP7).

Розділ 4 «Зміни основних фізіологічних параметрів функціонування серцево-судинної системи при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії» присвячений визначенню кардіодинаміки у SHR у порівнянні з нормотензивними щурами. Автор доводить, що у спонтанно гіпертензивних щурів спостерігається зниження насосної функції серця, порушення розслаблення міокарду, збільшення артеріальної жорсткості. Застосування біофлаваноїду кверцетину у гіпертензивних щурів супроводжувалось покращенням насосної функції серця, покращенням показників діастолічної та систолічної функції. Крім того кверцитин сприяв нормалізації порушеного обміну ліпідів та ЛПІ крові, що відмічалось у спонтанно гіпертензивних щурів.

Розділ 5 « Морфологічні ультраструктурні зміни у тканинах аорти при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії. Експресія генів субодиниць протеасоми та активність останньої у тканинах аорти» присвячений вивченню структурно-функціональних змін аорти при спонтанній гіпертензії у щурів. Отримані дані свідчать про те, що у SHR відмічаються ознаки атеросклеротичного та артеріосклеротичного ураження аорти. На експериментальній моделі АГ у СГЩ встановлено, що у патогенезі АГ мають значення експресія генів, що кодують субодиниці протеасоми, що призводить до зміни протеасомної активності і лежить в основі як підвищення АТ, так і у розвитку структурно-функціональних змін судинної стінки, а також можливість їх корекції за допомогою експериментального лікування із застосуванням інгібітору активності протеасом кверцетину.

У розділі 6 «Зміни основних фізіологічних параметрів функціонування серця при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії» автор продемонстрував ремоделювання серця у щурів з артеріальною гіпертензією. Автором доведена протекторна дія кверцетину на процеси фіброзування у спонтанно гіпертензивних щурів, його стабілізуюча дія на структурні компоненти міокарду.

У розділі 7 представлений аналіз та узагальнення отриманих результатів дослідження, де здобувач логічно підводить підсумок проведених досліджень.

Завершують роботу висновки й практичні рекомендації, які в повній мірі відповідають поставленій меті і завданням роботи і логічно впливають з проведеного дослідження.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях

Основні положення дисертаційної роботи в достатній мірі відображені в авторефераті, 8 опублікованих статтях і 9 тезах, в тому числі 5 – на зарубіжних конференціях. Результати роботи були представлені і обговорювались на наукових конференціях, з'їздах і конгресах. Автореферат дисертації повністю відповідає основним положенням дисертації і сучасним вимогам.

Зауваження та рекомендації щодо дисертації та автореферату.

1. Список використаних джерел обмежується тільки 91 джерелом, що можливо пов'язано зі специфічними методами дослідження, які використовував автор.
2. У визначенні наукової новизни можна було б більш чітко визначити особливості генотипування, що були отримані як у клінічних умовах, так і в експерименті, а не обмежуватись визначенням «мають суттєві відмінності».
3. У відповідності до даних літератури коефіцієнт атерогенності (або індекс атерогенності) розраховується як співвідношення ХС не ЛПВЩ (сума проатерогенних фракцій ЛП: ЛПНЩ + ЛПДНЩ) до ХС ЛПВЩ. Крім того, при ГТЕ він може розраховуватись як відношення вмісту ТГ до ХС ЛПВЩ, або як відношення вмісту апо В до апо АІ. Вказаний у дисертації спосіб визначення індексу атерогенності відносить вміст ЛПДНЩ до антиатерогенних ЛП, що неможливо в умовах ГТЕ, яка відмічається у СГЩ в експериментальній частині дисертації.
4. Яким чином був встановлений діагноз АГ у підлітків? Чи враховували ріст підлітків для встановлення діагнозу АГ.

5. Інформовану згоду на дослідження підписували всі особи, що приймали участь, або їх опікуни. У відповідності до чинного законодавства в Україні, інформовану згоду повинні обов'язково підписати батьки (обидва) та особа, що досягла віку 14 років (обов'язково), або особа до 14 років (за бажанням).
6. В результаті яких процесів розвиваються зміни структурно-функціональних властивостей міокарду та судинної стінки? Дані ряду сучасних як експериментальних, так і клінічних досліджень свідчать про те, що ремоделювання міокарду та судинної стінки може розвиватись ще на тлі нормального артеріального тиску внаслідок активації локальних РАС?
7. Як автор може пояснити розвиток порушень метаболізму ліпідів та ЛП крові у СГЩ?
8. В авторефераті відмічено, що рівень ЛПНЩ у СГЩ був в 3,3 рази нижчим, ніж у контрольних щурів. Які патогенетичні механізми даних процесів?

Проте ці зауваження в значній мірі є дискусійними, відображують складність проблеми, яка вирішувалась, її новизну і не знижують в цілому позитивної оцінки проведеного дослідження, його наукової та практичної значимості.

Загальний висновок щодо дисертаційної роботи

Аналіз дисертаційної роботи Гончарова Сергія Вікторовича «Молекулярно-генетичні механізми порушення протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та підходи до її корекції», дозволяє зробити висновок, що вона є самостійно виконаною науковою працею, в якій проведено вирішення конкретної задачі, спрямованої на з'ясування ролі протеасомного протеолізу у розвитку артеріальної гіпертензії з визначенням генетичної схильності, зміни експресії генів, що визначають дані зміни, активності протеолітичного комплексу та запропонований метод фармакологічної корекції виявлених порушень із застосуванням інгібітора протеасомної активності.

За своєю актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною, науковою та практичною значимістю отриманих результатів, обґрунтованістю висновків дисертаційна робота **Гончарова Сергія Вікторовича «Молекулярно-генетичні механізми порушення протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та підходи до її корекції»**, відповідає вимогам “Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 року (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.01.2015 року та №1159 від 30.12.2015 року), що пред’являються до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Офіційний опонент

доктор медичних наук, професор,
завідувач відділу клінічної фізіології та генетики
ДУ «ННЦ «Інститут кардіології
ім. академіка М.Д.Стражеска»
НАМН України



Т.В.Талаєва

Підпис Т.В.Талаєвої засвідчую:
зав. відділом кадрів
ДУ «ННЦ «Інститут кардіології
ім. академіка М.Д.Стражеска»
НАМН України



Н.В.Асташкіна

15.03.2021