

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Мись Лідії Анатоліївни

«Роль активації синтезу ендogenous сірководню у відновленні функціонального стану серцево-судинної системи старих щурів»,

яка подана до захисту у спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Характерними проявами старіння є розвиток оксидативного і нітрозативного стресу, запальних реакцій, ендотеліальної та мітохондріальної дисфункції, зниження скоротливої спроможності міокарда та його діастолічного розслаблення. Ці та інші вікові зміни призводять до зниження функціональних резервів серцево-судинної системи, створюють передумови для розвитку серцево-судинних захворювань, а тому потребують відповідної корекції.

Останнім часом з'являється все більше даних про те, що газовий трансмітер сірководень володіє вазо- та кардіопротекторними властивостями, зокрема індукує вазорелаксацію, зменшує окисний стрес, чинить захист від ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарда, має протизапальний ефект.

Дисертаційна робота Л.А. Мись присвячена дослідженню ефектів, зумовлених підвищенням синтезу сірководню (H_2S), а саме його впливу на функціональний стан серцево-судинної системи старих щурів.

На відміну від попередніх досліджень, у яких для підвищення рівня сірководню в тканинах застосовувалось введення донорів H_2S , у даній роботі було використано принципово інший підхід – стимуляцію ендogenous

синтезу сірководню шляхом курсового введення коензиму H_2S -синтезуючих ферментів піридоксаль-5-фосфату (П-5-Ф).

Таким чином, обраний напрям дисертаційного дослідження є актуальним, оскільки вирішує важливе для вікової фізіології завдання відновлення порушених при старінні функцій серця та судин. Дисертаційне дослідження відповідає пріоритетним напрямкам розвитку сучасної науки.

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

Дисертаційна робота Мись Лідії Анатоліївни виконана у відповідності з науковими програмами відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт: «Вивчення впливу сірководню на діяльність серця, судинний тонус і функціональний стан мітохондрій», 2010-2013 р.р. (№ держреєстрації 0107U005336) та «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму», 2014-2018 р.р. (№ держреєстрації 0113U007276). Л.А. Мись була виконавцем окремих фрагментів вказаних НДР.

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

Робота виконана на підставі обстеження достатньої кількості молодих ($n=50$) і старих ($n=100$) щурів лінії Вістар, що дозволило об'єктивно продемонструвати та оцінити особливості досліджуваних показників та провести належним чином статистичну обробку даних.

Дисертанткою використані високоінформативні сучасні фізіологічні, біохімічні, генетичні методи досліджень.

Положення і висновки дисертації базуються виключно на даних власних досліджень, які добре проаналізовані, узагальнені і обговорені з урахуванням ретельно проведеного аналізу значної кількості відібраних літературних джерел.

Коректна статистична обробка цифрового матеріалу результатів досліджень, що проведена з використанням ліцензійного програмного статистичного пакету Excell 2010 (MS Office XP) та Origin 8.0 («Microcal Software Inc.»), дала можливість автору дійти до формулювання обґрунтованих і достовірних положень, висновків і рекомендацій.

Експериментальні дослідження проводились з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986) та Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях». Протоколи досліджень, представлених в дисертаційній роботі, розглянуті та затверджені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології імені Богомольця НАН України (дозвіл №1/13 від 15.03.2017).

Результати дисертації відображено в 15 публікації, з яких 5 статей у провідних вітчизняних і зарубіжних фахових наукових виданнях, рекомендованих ДАК України, та 9 тез доповідей на наукових конференціях. Отримано патент на корисну модель «Спосіб покращення розслаблення гладеньких м'язів судин за рахунок відновлення рівнів синтезу сірководню при старінні» (№ 122865 від 25.01.2018 р.).

Всі розділи автореферату охоплюють матеріали дисертаційної роботи, де автором чітко, послідовно у лаконічній формі викладені основні положення, висновки та одержані результати дослідження. Текст автореферату відповідає змісту дисертації.

Таким чином, наукові положення, висновки та рекомендації повністю ґрунтуються на одержаних результатах, логічно пов'язані із сутністю роботи, підтверджені результатами статистичної обробки та аргументовані. Ключові положення та результати дисертаційної роботи добре представлені на вітчизняних і міжнародних наукових форумах.

Наукова новизна отриманих результатів.

Наукова новизна полягає в тому, що дисертантом вперше встановлено нормалізацію концентрацій сірководню у мітохондріях серця, тканинах серця та аорти під впливом курсового застосування П-5-Ф у старих тварин, у яких вміст H_2S до застосування П-5-Ф був суттєво знижений порівняно із молодими.

Автором доведено, що підвищення ендogenous синтезу сірководню сприяє обмеженню проявів оксидативного стресу в тканинах серця і судин при старінні. Також продемонстровано, що застосування П-5-Ф пригнічує Ca^{2+} -індуковане відкривання мітохондріальної пори та зменшує її підвищену чутливість до індуктора у мітохондріях серця старих щурів, що пояснює один із механізмів кардіопротекторної дії П-5-Ф.

Наслідком перерахованих змін було відновлення систолічної та діастолічної функцій ізолюваного серця старих тварин після ішемії-реперфузії, відновлення пригніченого у старих організмів ендотелій-залежного розслаблення гладеньких м'язів аорти.

Теоретичне значення отриманих результатів.

Завдяки проведеному дослідженню розширено існуючі уявлення щодо впливу сірководню на функціональний стан серцево-судинної системи старих щурів, зокрема на систолічну і діастолічну функції ізолюваного серця та ендотелій-залежне розслаблення фрагментів аорти.

Практичне значення одержаних результатів.

Продемонстровано принципову можливість використання коензиму H_2S -синтезуючих ферментів П-5-Ф для відновлення у тканинах серця і судин синтезу сірководню, який володіє кардіопротекторними і вазопротекторними властивостями. Результати дослідження обґрунтовують подальші клінічні дослідження у напрямку вивчення ефективності застосування П-5-Ф при серцево-судинних захворюваннях у хворих літнього віку.

Оцінка структури, змісту та форми дисертації.

Дисертаційна робота Мись Л.А. оформлена відповідно до «Вимог до оформлення дисертації», затверджених наказом МОН України №40 від 12.01.2017 року. Дисертація є завершеним фундаментальним дослідженням.

Роботу викладено на 142 сторінках машинописного тексту (обсяг основного тексту становить 109 сторінки). Структура дисертації цілком узгоджується з її назвою, метою і завданнями дослідження.

Дисертація складається із анотацій українською та англійською мовами, вступу, розділу огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, розділу результатів власних досліджень, обговорення та узагальнення, висновків, списку із 224 використаних джерел та додатка. Дисертація ілюстрована 8 таблицями і 19 рисунками. Наукова і літературна якість подання матеріалу та стилю дисертації не викликають заперечень.

Анотації оформлено згідно з вимогами, вони містять стислу інформацію про основні положення дисертаційної роботи. У анотації роботи подано найважливіші результати дослідження та підкреслено їхню новизну. Порушень академічної доброчесності немає.

У «**Вступі**» (6 сторінок) обґрунтовано доцільність та актуальність виконання дисертаційного дослідження, зв'язок з науковими програмами Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де виконувалася робота. Чітко сформульовані мета, завдання, об'єкт, предмет та методи дослідження. Сформульована наукова новизна, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, наведена інформація про апробацію результатів дослідження та особистий внесок дисертантки.

Розділ 1 «Огляд літератури» викладений на 27 сторінках, містить кілька підрозділів. Детально описано властивості сірководню, його ендогенний синтез та роль даного газового трансмітера у серцево-судинній системі. Також охарактеризовано піридоксаль-5-фосфат, який є кофактором ферментів синтезу сірководню, та описано його біологічну роль.

Розділ 2 «Матеріали та методики досліджень» викладений на 12 сторінках. Описано підбір і формування дослідних груп, методи проведення експериментів. Детально описані методики та послідовність виконаного дослідження із ретельною характеристикою досліджуваних показників, описано основні методологічні принципи, яких дотримувались під час проведення досліджень. Отримані результати опрацьовані сучасними методами варіаційної статистики. Експериментальні дослідження проведені у відповідності до біоетичних і правових вимог щодо роботи з хребетними тваринами.

Розділ 3 “Результати та їх обговорення” викладений на 43 сторінках і складається з 6 підрозділів, у яких наведені основні результати досліджень відповідно до визначених задач дисертаційної роботи. А саме:

- у підрозділі 3.1 автор наводить результати дослідження впливу П-5-Ф на вміст H_2S у серцево-судинній системі старих щурів. Показано, що курсове введення П-5-Ф призводить до відновлення суттєво знижених у старих тварин концентрацій сірководню у мітохондріях серця, тканинах серця та аорти.
- у підрозділі 3.2 автор наводить дані експериментальних досліджень, де показано, що відновлення вмісту ендogenous H_2S у тканинах серцево-судинної системи старих тварин відбувається за рахунок збільшення експресії генів, що кодують ферменти його синтезу – CSE та 3-MST.
- у підрозділі 3.3 наведено результати дослідження зміни показників оксидативно-нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в серцево-судинній системі старих щурів при активації ендogenous синтезу H_2S . Автор робить висновок, що активація ендogenous синтезу H_2S призводить до суттєвого пригнічення оксидативного стресу, що характеризувався зниженням швидкості генерації супероксидного та гідроксильного аніон-радикалів, а також вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів порівняно з суттєво підвищеними значеннями цих

показників у тканинах інтактних старих тварин. Внаслідок стимуляції ендогенного синтезу H_2S у старих щурів відбулося зниження показників нітрозативного стресу, а саме активності індукцйбельної NO-синтази та збільшення активності конститутивної NO-синтази, що призводило до посилення конститутивного синтезу NO, який відіграє суттєву роль у реакціях серцево-судинної системи.

- у підрозділі 3.4 автор описує результати експериментів стимуляції ендогенного синтезу сірководню, що призводило до пригнічення Ca^{2+} -індукованого відкривання мітохондріальної пори та зменшення її чутливості до Ca^{2+} у мітохондріях серця старих щурів.
- у підрозділах 3.5 та 3.6 на підставі отриманих даних автор відзначає, що застосування П-5-Ф відновлювало синтез ендогенного H_2S і конститутивного NO, що сприяло поліпшенню пригніченого ендотелій-залежного розслаблення гладеньких м'язів аорти та покращенню функцій серця у старих щурів.

У заключному розділі “Аналіз та узагальнення результатів дослідження” (6 сторінок) дисертантка проводить співставлення одержаних експериментальних даних з результатами робіт інших авторів, з залученням до аргументації своїх тверджень значної кількості літературних джерел. Аналіз і узагальнення результатів дослідження дозволили обґрунтувати основні положення дисертаційного дослідження, оформити загальну схему та зробити аргументовані висновки, які сформульовані чітко, відповідають меті та завданням дисертаційної роботи.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні зауваження.

1. В огляді відсутні дані літератури щодо вікових змін при старінні тих функцій, які автор досліджувала у своїй роботі – ендотелій-залежної вазодилатації, скоротливості міокарду та його діастолічного розслаблення, показників оксидативного і нітрозативного стресу з відповідними

посиланнями на літературні джерела. В огляді відсутні посилання на попередні дослідження співробітників відділу фізіології кровообігу по проблематиці дослідження.

2. В таблицях 3.2, 3.3, 3.5 розділу 3 представлені дані щодо вмісту тромбоксану, лейкотрієну C_4 та сечової кислоти, проте в розділі 2 “Матеріали і методи дослідження” немає даних про методи їх визначення.

3. В розділі 2 не вказано, яка кількість тварин була використана для вирішення того чи іншого завдання дисертаційного дослідження. В розділі 3 на рисунках 3.1–3.3, 3.7–3.16 не вказана кількість тварин кожної із трьох груп. Це ж зауваження стосується і автореферату. В заголовках таблиць 3.1–3.8 вказана кількість особин ($n=9$), але не зрозуміло чи це загальна кількість в трьох групах чи в кожній з трьох груп було по 9 особин. Потребує пояснення.

4. Дисертант в кількох місцях (с. 64, с. 82, с. 92, с. 97) пише "ми раніше показали..." і посилається на статті своїх колег, у яких вона не є співавтором.

5. В списку використаної літератури з 224 джерел протягом останніх 5 років (2016-2020) опубліковано 19%.

Зроблені зауваження не носять принципового характеру і не впливають на загальну позитивну оцінку рецензованої роботи.

Після аналізу дисертаційної роботи хотілося б отримати відповіді на наступні запитання:

1. Чи відповідає нормам біоетики проведення декапітації тварин без наркозу?
2. Поясніть, чому в дослідженні було застосовано дозу піридоксаль-5-фосфату 0,7 мг /кг маси тіла, а не іншу дозу, а курс застосування становив 2 тижні.
3. Охарактеризуйте механізми антиоксидантної дії сірководню.

ВИСНОВОК

про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Мись Лідії Анатоліївни «Роль активації синтезу ендогенного сірководню у відновленні функціонального стану серцево-судинної системи старих щурів», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, є самостійним, оригінальним, завершеним науковим дослідженням, результати якого вирішують важливе наукове завдання фізіології.

За актуальністю теми дослідження, науковою новизною отриманих результатів, їх теоретичним та практичним значенням, рівнем методичного вирішення поставлених завдань, а також враховуючи широке висвітлення результатів у вітчизняній та світовій науковій літературі, їх обговорення на численних міжнародних форумах дисертаційна робота повністю відповідає п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 (зі змінами, внесеними в Постановою КМ № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016) щодо кандидатських дисертацій, а її автор Лідія Анатоліївна Мись заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю – 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент

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

Шатило Валерій Броніславович

