

ВІДГУК

**офіційного опонента доктора медичних наук, професора Н.М. Кононенко
на кандидатську дисертацію Бібіченко Вікторії Олександрівни
«Патогенетичне обґрунтування можливості використання
глюкозамінілмураміддипептиду для профілактики хронізації запалення»
за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія,
яка представлена до спеціалізованої вченої ради Д 64.600.03 при
Харківському національному медичному університеті МОЗ України**

Актуальність теми

Запалення є центральною проблемою медицини протягом усієї історії. Медична й соціальна значущість запальних захворювань із кожним роком зростає як в Україні, так і в усьому світі. Хронічне запалення (ХЗ) є ключовою патогенетичною основою великої кількості захворювань, таких як атеросклероз, ожиріння, рак, хронічне обструктивне захворювання легень, бронхіальна астма, нейродегенеративні захворювання, розсіяний склероз, ревматоїдний артрит та інших. Водночас механізми ХЗ вивчені недостатньо. Незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених хронічним запальним захворюванням, загальна патологія і профілактика ХЗ досліджуються не в повному обсязі.

Головною ланкою патогенезу запалення є медіаторна регуляція. Серед медіаторів запалення особливе місце посідають цитокіни, оскільки вони визначають події у вогнищі запалення та запускають системні прояви процесу за рахунок залучення імунної та інших систем. Дослідження цитокінового профілю у вогнищі запалення є предметом багатьох досліджень останніх років. Це обумовлено перш за все розвитком сучасної фармакології, що дозволяє заблокувати дію певних цитокінів як системно, так і локально.

Тому актуальним залишається патогенетичне обґрунтування можливості використання гемомодуляторів для профілактики ХЗ, які стимулюють синтез цитокінів, впливають на вміст їх в периферичній крові. Глюкозамінілмураміддипептид (ГМДП) (N-ацетилглюкозамініл-1-4-N-ацетилмурамоїл-L-аланіл-D-ізоглутаміні) стимулює функціональну активність макрофагів та синтез цитокінів. Він застосовується в комплексній терапії

імунодефіцитних станів при хронічних в'яло протікаючих рецидивуючих інфекційно-запальних захворюваннях різної локалізації. Але можливість використання ГМДП для профілактики ХЗ не вивчалася.

Зв'язок теми дисертації з плановими науковими дослідженнями та науковими програмами

Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Харківського національного медичного університету МОЗ України (ХНМУ). Комплексні теми: «Міжклітинні взаємодії в патогенезі запалення: взаємодія еозинофілів і тканинних базофілів» (номер державної реєстрації 0109U001742), «Патогенез ушкоджуючої дії на організм негативних екзогенних факторів у сучасних умовах» (номер державної реєстрації 0115U000991) 2015–2017 рр.

Новизна дослідження та одержаних результатів

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає в тому, що вперше було проведено комплексне дослідження, яке присвячене патогенетичному обґрунтування використання глюкозамінілмураміддипептиду для профілактики хронічного запалення, а також виявлено зниження інфільтрації запаленої тканини гранулоцитами на протязі усього дослідження. Також посилюється інфільтрація запаленої тканини моноцитами й лімфоцитами – посилюється елімінацію флогогену, що свідчить про зменшення хронізації запалення. Показано, що застосування глюкозамінілмураміддипептиду викликає зниження хронізації запалення за рахунок більшої активації гемопоезу і таким чином надходження лейкоцитів у кров і вогнище в початкові терміни запалення.

Визначено автором, що на тлі застосування глюкозамінілмураміддипептиду активація моноцитопоезу й лімфоцитопоезу в ранні терміни виражена більше, а в подальші терміни вона виражена менше.

Також виявлено, що різко змінюється продукція прозапальних цитокінів ФНП- α , ІЛ-2 та протизапальних ІЛ-10 на тлі введення глюкозамінілмураміддипептиду порівняно з природним перебігом вторинно ХЗ.

Отримані результати свідчать про можливість і доцільність використання ГМДП при гострому запаленні для профілактики хронізації, а також для

лікування ХЗ з метою зменшення його подальшого прогресування, що має значення для практичної медицини.

Теоретичне та практичне значення роботи

Дисертаційна робота належить до фундаментальних досліджень. Одержані результати свідчать про можливість детально дослідити реакції системи крові за природного перебігу вторинно хронічного карагієнового запалення та вивчити зазначені реакції системи крові при вторинно хронічному карагієновому запаленні на тлі введення глюкозамінілмураміддипептиду.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Структура дисертаційної роботи логічна і послідовна. Завдання дослідження повною мірою відповідають поставленій меті. Дослідження проведено на 132 щурах-самцях лінії WAG масою тіла 180–200 г. Контролем для природнього перебігу запалення були інтактні щури. Контроль для запалення на тлі введення ГМДП – щури, яким вводили препарат без подальшого викликання запалення.

Моделлю запалення було карагієнове хронічне асептичне запалення, спричинене внутрішньом'язовим введенням в ділянку стегна 10 мг λ -карагієну (Sigma, США) в 1 мл ізотонічного розчину хлориду натрію

Роботу проведено із застосуванням принципів, які пройшли державний метрологічний контроль. Матеріали, використані в дисертаційній роботі, повністю відповідають вимогам, що висуваються до первинної документації, розглянуті та затверджені комісією з етичних питань та біоетики. Методи дослідження описані в роботі повністю відповідають меті і завданням дослідження.

Процедури на тваринах, а також виведення тварин з експерименту (шляхом миттєвої декапітації) проводили згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986 р.), а

також Гельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964–2000 рр.), відповідно до закону України №3447-IV від 21.02.2006 року «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також відповідно до принципів, викладених в методичних рекомендаціях Національного Комітету з питань біоетики при Президії НАН України, Комітету з біоетики при Президії НАН України, Інституту фармакології і токсикології НАМН України, Державного фармакологічного центру МОЗ України, біоетичної експертизи до клінічних та інших наукових досліджень, які виконуються на тваринах (Київ, 2006). Комісія з етичних питань ХНМУ (протокол № 2 від 7 лютого 2018 р.) визначила, що умови утримання тварин і маніпуляції відповідають нормам чинного законодавства.

Зміст дисертації відповідає темі дисертації і повністю розкриває завдання дисертаційної роботи. Обсяг проведених досліджень дозволив автору визначити у докладній динаміці клітинно-тканинну динаміку вогнища запалення, клітинний склад вогнища запалення, ГМДП лейкоцитарну реакцію і концентрацію цитокінів у сироватці крові.

Автором було визначено клітинний склад вогнища запалення шляхом підрахунку кількості нейтрофілів, базофілів, еозинофілів, лімфоцитів, моноцитів, макрофагів, тканинних базофілів, фібробластів, плазматичних клітин у гістологічних препаратах при забарвленні гематоксиліном-еозином

Лейкоцитарну реакцію крові вивчали на підставі визначення загальної кількості лейкоцитів у крові та лейкоцитарної формули стандартними методами.

Був вивчений рівень цитокінів (ФНП- α , ІЛ-2, ІЛ-10) в сироватці крові методом імуноферментного аналізу з використанням тест-систем фірми «ТОВ Протеїновий контур».

ГМДП вводили під шкіру спини щурам в дозі 0,1 мг 0,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду щодня протягом усього експерименту. Дозу для щурів визначали за константою біологічної активності за формулою Риболовлева.

Статистичне опрацювання результатів проводили за критерієм Стьюдента. Побудову графіків здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel-2007.

Структура і обсяг дисертації

Дисертаційна робота Бібіченко В.О. побудована традиційно, згідно з вимогами до кандидатських дисертацій і містить 188 сторінок комп'ютерного тексту. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Дисертація ілюстрована 11 таблицями та 36 рисунками. Перелік використаних літературних джерел містить 201 назву: 90 робіт вітчизняних авторів та 111 – іноземних (обсягом 20 сторінок).

Характер змісту роботи

Дисертація виконана на високому науковому та методичному рівні. Анотація оформлена згідно з вимогами до оформлення дисертації, наведено список праць, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації.

У вступі відображено актуальність теми, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, сформульовано мету та її значення, дана інформація про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дослідження, публікації, обсяг і структуру дисертації.

У першому розділі автор детально описує значення системи крові в патогенезі запалення, а також значення системи крові в механізмах хронізації запалення.

Обґрунтовує що, запалення є універсальною захисно-приспосувальною компенсаторною реакцією, та розвивається у відповідь на пошкодження і відноситься до філогенетично найстаріших типів захисних реакцій організму. Запалення є адаптивним та індуктивним процесом, залежним від суми клітинних і гуморальних чинників, багато з яких продукується у відповідь на дію запальних стимулів. Загальновідомими тригерами запалення є продукти тканинного пошкодження, бактеріальні ліпополісахариди, імунні комплекси

та інші ініціюючі фактори. Особливе місце в реалізації програми запалення і протизапальної реакції займає системи крові, що є основною ефекторною системою процесу запалення. Формування адекватної реакції-відповіді на дію пошкоджуючих чинників вимагає активної роботи клітин, що полягає у синтезі молекул, направлених на збудження, розвиток і гальмування запальної реакції.

Порушення механізмів завершення запальних процесів призводить до переходу запалення у хронічну форму і спричиняє виникнення численних захворювань людини. Аналіз даних літературних джерел дозволяє стверджувати, що тривалий запальний процес призводить до зниження імунологічної реактивності організму. На ефекторному рівні хронізація запалення пов'язана, перш за все, із змінами у системі крові, що розвиваються на тлі персистенції пошкоджувального чинника. Саме тому дослідження гематологічних маркерів хронізації запалення є найактуальнішою проблемою, що сприяє на основі вивчення патогенезу патологічного процесу обґрунтувати методи їх корекції.

У другому розділі здобувач детально описує матеріали й методи дослідження. Описує, що дослідження проводилося на 132 щурах-самцях лінії WAG масою тіла 180–200 г. Контролем для природнього перебігу запалення були інтактні щури. Контроль для запалення на тлі введення ГМДП – щури, яким вводили препарат без подальшого викликання запалення.

Моделлю запалення було карагіненове хронічне асептичне запалення, спричинене внутрішньом'язовим введенням в ділянку стегна 10 мг λ -карагінену (Sigma, США) в 1 мл ізотонічного розчину хлориду натрію. У докладній динаміці запалення, починаючи з 6-ої год до 28-ї доби, досліджували реакції системи крові: клітинно-тканинну динаміку вогнища запалення, клітинний склад вогнища запалення, кістково-мозкове кровотворення, лейкоцитарну реакцію і концентрацію цитокінів у сироватці крові.

ГМДП вводили під шкіру спини щурам в дозі 0,1 мг 0,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду щодня протягом усього експерименту. Дозу для щурів визначали за константою біологічної активності за формулою Риболовлева.

У третьому розділі представлені результати дослідження реакції системи крові, кісткового мозку стегна та вміст інтерлейкінів ФНП- α , ІЛ-2 та ІЛ-10 за природнього перебігу вторинно хронічного запалення та на тлі введення глюкозамінілмураміддипептиду.

Четвертий розділ присвячений аналізу та узагальненню результатів дослідження. Під час вивчення клітинно-тканинної динаміки при введенні як карагінену, так і карагінену в поєднанні з ГМДП, розвивається спочатку гостре запалення з переважанням альтеративних та ексудативних реакцій, після чого настає зміна фаз запалення. Спостерігається проліферація клітинних і тканинних елементів, і запалення набуває характер проліферативного з формуванням гранульом.

При аналізі клітинного складу вогнища запалення спостерігається значний протизапальний ефект ГМДП за карагіненового запалення. Цей ефект відзначається з боку різних складових клітинно-тканинної реакції вогнища запалення: лейкоцитарної інфільтрації, проліферації сполучнотканинних елементів. Використання ГМДП впливає на вміст різних клітинних елементів, характерних для запальної реакції, а зміни клітинного складу вогнища карагіненового запалення на його периферії ідентичні з такими в центрі, однак менше виражені.

При запаленні на тлі застосування ГМДП порівняно з природнім перебігом процесу у ранні терміни запалення у вогнище емігрує більша кількість лейкоцитів, в порівнянні з більш віддаленими термінами, так як їх виходить менша кількість.

Показано також, що відбувається в ранні терміни більше вимивання клітин з кісткового мозку у кров, більш істотно стимулює гемопоез, а в більш пізні терміни, відповідні періоду хронізації запалення – менша активація гемопоезу.

Виходячи з показників лейкоцитарної реакції периферичної крові в динаміці карагіненового вторинно ХЗ, застосування ГМДП призводить до зниження хронізації процесу, що свідчить про можливість використання препарату для профілактики ХЗ.

Як видно зі змісту цитокінів ФНП-а, ІЛ-2, ІЛ-10 в периферичній крові в динаміці карагієнового вторинно ХЗ, застосування ГМДП призводить до зниження хронізації процесу, що сприятливо впливає на перебіг цього процесу і свідчить про можливість використання цього препарату для профілактики ХЗ.

Висновки дисертаційної роботи відображають отримані результати, повною мірою відповідають меті та завданням дослідження, є лаконічними, завершеними та інформативними.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і в авторефераті

Матеріали дисертації опубліковано у 15 наукових працях, зокрема, у 6 статтях, з яких 4 надруковано у наукових фахових виданнях України, що входять до переліку ДАК України, 2 статті у закордонному науковому періодичному виданні (Польща), 1 патент на корисну модель, 1 акт галузевого нововведення, 7 тез у матеріалах конгресів, конференцій.

Ідентичність змісту автореферату й основних положень дисертації

Автореферат дисертації за змістом та формою відповідає вимогам МОН України і містить усі основні положення дисертації.

Зауваження щодо змісту й оформлення дисертації і автореферату

1. Є некоректні вислови, наприклад, природній перебіг запалення, природній перебіг вторинно хронічного карагієнового запалення, звичайний перебіг запалення.

2. Бажано б було більш детально надати модель хронічного асептичного запалення, бо є не зрозумілим карагієн вводили одноразово чи багаторазово.

3. Бажано було б пояснити режим введення глюкозамінілмурамідпептиду: 0,1 мг це на одну тварину або на кг маси.

4. Бажано було б дати назви, серії, термін придатності тест систем для визначення рівня цитокінів.

5. Першим завданням дослідження є дослідження реакції системи крові за природнього перебігу вторинно хронічного карагієнового запалення, а першим підпунктом цього завдання дослідження клітинних реакцій вогнища

запалення, але ж клітинна-тканинна динаміка у вогнищі запалення не є системою крові. Також цитокіни є частиною імунної системи. Доцільним було б зробити окремі завдання дослідження.

6. Першим завданням роботи було дослідження системи крові при хронічному карагієновому запаленні, але не має жодного висновку щодо отриманих результатів стосовно цієї частини дисертації.

7. В роботі зустрічаються поодинокі граматичні помилки і невдалі стилістичні висловлювання.

Але зазначені недоліки не мають принципового значення і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Також хотілося б у порядку дискусії почути відповідь дисертанта на такі **запитання:**

1. Ви моделювали хронічне асептичне запалення. Як Ви можете пояснити наявність на 5-ту добу перебігу запалення наявність фібринозно-гнійного ексудату в центрах вогнищ некрозу та запального інфільтрату?

2. Чому Ви вважаєте, що підвищення рівня інтерлейкіна-10 на тлі підвищеної концентрації інтерлейкіна-2 на 21-у, 28-у добу експерименту свідчить про хронізацію процесу? Відомо, що гіперактивація продукції протизапального інтерлейкіна-10 на тлі депресії маркера клітинно-опосередкованого імунного захисту – інтерлейкіна 2 сприяє превалюванню процесів ушкодження та апоптозу на маркерами активації.

3. Застосування глюкозамінілмураміддипептиду стимулює накопичення фібробластів у вогнищі запалення у початкові терміни, що, Ви вважаєте, сприяє більш вираженій репарації у гострий період запалення і зниженню розвитку сполучної тканини у період вираженої хронізації процесу. Чому Ви вважаєте саме так, адже у будь-якому разі фібробласти разом з новоствореними судинами створюють грануляційну тканину, а репарація здійснюється, в основному, за рахунок міграції і мітотичного поділу клітин із базального шару, а також диференціювання регенеруючого епідермісу.

**Відповідність дисертації обраній спеціальності, профілю спеціалізованої
вченої ради та вимогам МОН України**

Дисертаційна робота Бібіченко Вікторії Олександрівни «Патогенетичне обґрунтування можливості використання глюкозамінілмураміддипептиду для профілактики хронізації запалення» є завершеною самостійною кваліфікаційною науковою працею, у якій містяться наукові положення та нові науково обґрунтовані результати у медичній галузі науки, зокрема в патофізіології, що вирішують важливу наукову задачу патогенетичного обґрунтування використання глюкозамінілмураміддипептиду для профілактики хронічного запалення.

Робота виконана на сучасному науково-методичному рівні, за актуальністю, об'ємом і методичним рівнем проведених досліджень, науковою новизною і практичною значимістю, глибиною аналізу, обґрунтованістю і достовірністю висновків і положень відповідає пункту 11 Постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів» (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), щодо кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

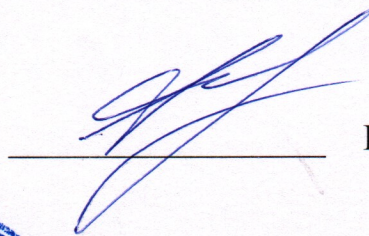
Офіційний опонент:

завідувач кафедри патологічної фізіології

Національного фармацевтичного

університету МОЗ України,


доктор медичних наук, професор



Н.М. Кононенко

Підпис Н.М. Кононенко ЗАСВІДЧУЮ:

В. о. начальника відділу кадрів



О.В. Купіна

