

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, старшого наукового співробітника, завідувача відділу гіпоксії Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України

Портниченко Алли Георгіївни

на дисертаційну роботу Ісаченко Марії Ігорівни

«Характеристика маркерів ремоделювання міокарда лівого шлуночка і стану системи оксиду азоту при фізіологічних впливах та експериментальних патологічних станах», представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 17.600.020 Запорізького державного медичного університету, що утворена наказом МОН України від 20.01.2021р. № 72 для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина»

1. Актуальність теми дисертаційної роботи

Проблема ремоделювання серця є важливим напрямком досліджень у кардіології в останні десятиріччя з огляду на участь цього патологічного процесу у розвитку серцевої недостатності. Багаточисленні клінічні спостереження довели, що через структурно-геометричні зміни лівого шлуночка, які включають процеси гіпертрофії міокарда та дилатації камер, у пацієнтів відбуваються зміни геометрії серця, порушення систолічної і діастолічної функції, що асоційовано з прогресією декомпенсації захворювань серцево-судинної системи. З огляду на це, встановлення множинних компенсаторних та патогенетичних механізмів, які на молекулярному рівні опосередковують ремоделювання серця різного генезу, є предметом особливої уваги сучасних досліджень.

Уявлення про «фізіологічні» причини ремоделювання серця у спорті стало причиною виділення деякими дослідниками (зокрема, J Scheuer, P Buttrick; JR McMullen та ін.) окремої форми гіпертрофії і ремоделювання -

«фізіологічної», та навіть виділення цілком окремих механізмів, які опосередковують розвиток «фізіологічної» і «патологічної» гіпертрофії, що є суперечливим, оскільки ці начебто відмінні її форми відповідають послідовним стадіям розвитку гіпертрофії міокарда, як єдиного патологічного процесу (Ф.З. Меерсон). На разі межа між «фізіологічним» і «патологічним» у ремоделюванні ґрунтується переважно на етіологічних аргументах і потребує детального вивчення. Іншим практичним питанням у цих дослідженнях є встановлення діагностичних і прогностичних маркерів ремоделювання серця.

У своїй дисертаційній роботі Ісаченко М.І. висвітлює питання інформаційної цінності морфоденситометричних маркерів паренхіматозно-стромальної перебудови міокарда при ремоделюванні, проводить порівняльний аналіз співвідношення запропонованих маркерів ремоделювання міокарда (кардіотрофін-1, тайгін, колаген I типу та анексин V) при дії помірної гіпобаричної гіпоксії різної тривалості на організм щурів та розвитку патологічних процесів, що супроводжуються постнавантаженням на серцевий м'яз (спадкова або ендокринно-сольова артеріальна гіпертензія).

Не викликає сумнівів, що для розуміння патогенетичного зв'язку особливостей змін структурної організації міокарда із етіологічними факторами та механізмами, які включаються ними, проведені дослідження співвідношення маркерного профілю ремоделювання і виявлення особливостей стану системи оксиду азоту міокарда, як можливого диригента-регулятора ремоделювання міокарда, що чинить протективну або пошкоджуючу дію, - сучасні та доцільні.

Враховуючи вищевикладене, тема дисертаційної роботи Ісаченко Марії Ігорівни «Характеристика маркерів ремоделювання міокарда лівого шлуночка і стану системи оксиду азоту при фізіологічних впливах та експериментальних патологічних станах» є актуальною та має наукову новизну.

2. Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами

Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патологічної фізіології, яка фінансувалась МОЗ України, на тему «Роль пептидергічних структур гіпоталамусу та стовбуру мозку в патогенезі артеріальної гіпертензії» (№ державної реєстрації 0117U002579), термін виконання 2017-2019 рр.

3. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій сформульованих в дисертації

Дисертаційна робота М.І. Ісаченко представлена як закінчене наукове дослідження, присвячене проблемі сучасної патологічної фізіології.

Робота виконана на високому науковому і методичному рівнях. Сформульовані автором наукові положення базуються на результатах, отриманих у патофізіологічному експерименті на 58 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar і 10 статевозрілих щурах-самцях лінії SHR. У роботі наведені об'єктивні ознаки «спроможності» моделей і характеристики, які чітко відповідають меті і завданням дисертації. Для аналізу результатів застосовано відповідні методи варіаційної статистики.

Отримані Ісаченко М.І. при виконанні роботи результати співставні з даними літературних джерел останніх років. Наукові положення, висновки, практичні і теоретичні рекомендації, сформульовані автором, повністю підтверджуються результатами, отриманими при використанні сучасних високоінформативних методів дослідження, таких як: інструментальні (неінвазивне вимірювання артеріального тиску), морфометричні (маса серця, його питома щільність та відсоток частки серця від загальної маси тварини), молекулярно-генетичні (дослідження експресії мРНК ізоформ ферменту NOS – nNOS, iNOS та eNOS), імуногістохімічні (визначення вмісту та концентрації імунореактивного матеріалу до ізоформ ферменту NOS – nNOS, iNOS та eNOS; кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину та анексину V), біохімічні (концентрація нітритозину в плазмі крові, вміст нітритів у

гомогенатах серця), морфоденситометричні (середня кількість ядер кардіоміоцитів у площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми / мкм², концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (Oog)).

Виходячи з викладеного, можна зазначити, що наукові положення і висновки, сформульовані в дисертаційній роботі, є обґрунтованими, логічно витікають зі змісту та мають високу наукову і практичну цінність.

4. Наукова новизна дослідження та одержаних результатів

Вперше на експериментальних моделях екстремальних (помірна гіпобарична гіпоксія різної тривалості) та патологічних (артеріальна гіпертензія різного генезу) впливів на серцево-судинну систему визначено характер структурних змін у міокарді, встановлено ключові ланки їхнього патогенезу та доведена роль регуляторної системи оксиду азоту.

Встановлено, що короткотривала 15-денна гіпоксія формує початкове ремоделювання міокарда з розвитком помірної гіпертрофії кардіоміоцитів, зниженням інтенсивності їхньої загибелі та підвищенням пружно-еластичних властивостей. Вперше визначено, що структурні перебудови в серцевому м'язі розвиваються на тлі збільшення показників експресії мРНК ізоформ NOS, зниження IPM до nNOS, помірного збільшення eNOS із переважанням у міокарді iNOS, що супроводжується підвищенням рівнів стабільних метаболітів NO нітритів на 21 % і нітротирозину на 40,8 %.

Показано, що довготривала гіпоксична експозиція протягом 60 діб призводить до ремоделювання міокарда з суттєвою гіпертрофією кардіоміоцитів, збільшенням жорсткості міокарда, значним фіброзом та масивним апоптозом кардіоміоцитів. Вперше встановлено, що ремоделювання серцевого м'язу відбувається через зміни співвідношення ізоформ ферменту NOS, характеризується збільшеною експресією конститутивних лізоформ і зниженою індукцибельною на фоні значного підвищення мРНК усіх 3-х форм; посиленням системного нітрозоксидативного стресу зі зниженням рівня нітритів на 21,8 % та значним

збільшенням концентрації нітротирозину в плазмі крові на 80,6 %.

Дослідження показало, що артеріальна гіпертензія, як есенціальна у SHR, так і вторинна, ендокринно-асоційована, в щурів із ендокринно-сольовою моделлю, формує розвинені патологічні прояви ремоделювання міокарда через збільшення маси серця, його питомої густини та показників експресії усіх 4-х маркерів ремоделювання. Вперше встановлені відмінності структурної перебудови серцевого м'язу, що характеризуються у щурів із есенціальною артеріальною гіпертензією помірною апоптотичною активністю з гіпертрофією кардіоміоцитів, фібротичними змінами та підвищеною жорсткістю міокарда. В той же час при ендокринно-сольовій артеріальній гіпертензії спостерігали значно виражені апоптоз і гіпертрофія кардіоміоцитів на тлі сформованого фіброзу з високою жорсткістю міокарда.

У проведеному дослідженні вперше встановлено, що при артеріальній гіпертензії зміни ізоформного профілю ферменту NOS у серцевому м'язі в моделі есенціальної артеріальної гіпертензії демонструють більш високі показники концентрації імунореактивного матеріалу до pNOS та eNOS із переважанням до iNOS на тлі підвищення мРНК усіх 3-х ізоформ, збільшений вміст кінцевих метаболітів NO нітритів на 18,8 % і нітротирозину на 26 %. При ендокринно-сольовій моделі артеріальної гіпертензії стан системи NO характеризується підвищеною експресією мРНК pNOS, eNOS і iNOS у 2,7, 2,8 і 5,7 разів, збільшенням ІРМ до них у міокарді із превалюванням pNOS; зменшенням рівнів нітритів на 11,7 % із збільшенням нітротирозину на 88,5 %.

5. Практичне значення результатів дослідження

У дисертаційній роботі експериментально доведено, що ремоделювання міокарда розвивається як при екстремальних впливах, так і при патологічних процесах у серцево-судинній системі, при цьому характер співвідношення маркерів ремоделювання та зміни системи оксиду залежать від етіології та тривалості впливу.

Розроблено інформативні критерії характеру ремоделювання міокарда в експерименті та визначено, що короткотривала помірна гіпобарична гіпоксія формує ремоделювання міокарда за гіпертрофічним типом із підвищенням пружно-еластичних властивостей серцевого м'язу та зниженням інтенсивності загибелі кардіоміоцитів, яке можна розглядати як пристосувально-компенсаторне. Довготривала гіпоксія призводить до патологічного ремоделювання міокарда за фіброзно-апоптотичним типом з вираженою гіпертрофією, фіброзом, збільшенням жорсткості міокарда та масивним апоптозом кардіоміоцитів. Артеріальна гіпертензія викликає патологічне ремоделювання міокарда, характер якого має модельні відмінності: це гіпертрофічно-фіброзний тип ремоделювання з помірно вираженими процесами апоптозу при есенціальній та гіпертрофічно-апоптотичний тип при ендокринно-сольовій гіпертензії.

Обґрунтована патогенетична роль системи оксиду азоту в ремоделюванні міокарда при впливах на серцево-судинну систему, що характеризується підвищенням мРНК ізоформ NOS на тлі збільшення концентрації нітритозину в плазмі щурів. Доведена етіопатогенетична залежність змін ізоформного профілю ферменту NOS при тривалих гіпоксичних впливах і артеріальній гіпертензії, що призводить до зменшення рівня нітритів на тлі збільшення нітритозину.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях

Основні положення дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на міжнародних та всеукраїнських наукових форумах: Конгресах Європейського Товариства Кардіологів (Frontiers in CardioVascular Biology 2018, Відень та м. Будапешт, 2020р.); Integrative Biology & Medicine, 2017; Всеукр. наук.-практ. конф. до 50-річчя заснування ЗДМУ, 2018р.; наук.-практ. конф. студентів в рамках I туру «Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з галузей звань і спеціальностей у 2018 – 2019 н.р.» Студенти-науковці ЗДМУ в сучасній медицині і фармації – 2019; Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної

медицини і фармації : матеріали I наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнарод. Учасстю, 2019; XX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка. (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.); IX з'їзду ендокринологів України, що присвячений 100-річному ювілею ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» (м. Харків, 19-22 лист. 2019 р.).

За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць: 6 статей, серед яких 3 статті в журналах, які індексуються міжнародними наукометричними базами (Web of Science); 2 статті в закордонних журналах, 1 стаття в науковому фаховому виданні України, 7 тез у матеріалах міжнародних і Всеукраїнських з'їздів і науково-практичних конференцій. Матеріали дисертації були оприлюднені на 11 конференціях і конгресах у формі виступів. За матеріалами дисертації було отримано 3 гранти.

Аналіз основного змісту опублікованих праць дає можливість зробити висновок, що всі наукові положення та висновки, представлені до захисту, знайшли своє відображення в опублікованих роботах.

7. Відповідність змісту дисертації встановленим вимогам

Обсяг та структура дисертації повністю відповідають вимогам, передбаченим п.п.10, 11 «ПОРЯДКУ проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 6 березня 2019 року (зі змінами, внесеними відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України від 21 жовтня 2020 року №979), відносно дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії. Основні теоретичні, наукові та практично-прикладні положення дисертаційної роботи Ісаченко М.І. відображені в анотації в повному обсязі. Дисертація відповідає спеціальності 222 «Медицина».

8. Структура та зміст дисертації

Дисертаційна робота викладена на 233 сторінках друкованого тексту, одним томом, написана в класичному стилі і складається зі вступу, огляду

літератури, опису методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел літератури, який містить 249 джерел (23 кирилицею та 226 латиною) та додатків. Структурний склад роботи пропорційний. Робота ілюстрована 41 рисунком й 23 таблицями.

У вступі дисертант підкреслює актуальність проблеми і наявність численних невирішених питань, формулює мету і завдання дослідження, демонструє наукову новизну і практичну значущість отриманих результатів.

Розділ 1. Детальний аналіз дисертаційної роботи показав, що огляд літератури написаний змістовно, використано достатній об'єм вітчизняних та закордонних джерел. Автором представлені сучасні дані щодо причин та можливих патогенетичних ланок ремоделювання міокарда лівого шлуночка серця при фізіологічних впливах та патологічних станах.

Розділ 2. В розділі «Матеріали та методи дослідження» автор детально характеризує обраний дизайн дослідження. Описані сучасні методи дослідження, лабораторні та інструментальні показники, досліджені в експерименті.

Розділ 3. В розділі «Морфофункціональна характеристика досліджуваних параметрів серцево-судинної системи у щурів експериментальних груп» представлені результати дослідження параметрів серцево-судинної системи у щурів із змодельованими екстремальними (гіпобарична гіпоксія різної тривалості: 15 і 60 діб) та патологічними (есенціальна та ендокринно-сольова артеріальні гіпертензії) впливами. Автор ретельно проаналізувала отримані дані щодо особливостей морфофункціонального стану серцево-судинної системи при різних за етіологією та тривалістю впливах завдяки сформованому комплексу досліджень, що включав: вимірювання артеріального тиску, масометричне та морфоденситометричне дослідження сердець щурів. Використання діагностичного комплексу дозволило провести комплектацію груп, підтвердити адекватність моделей артеріальної гіпертензії, оцінити ступінь важкості сформованої

патології та виявити загальні ознаки, що формуються при тривалих впливах на серцево-судинну систему.

Розділ 4. У четвертому розділі «Патогенетичні особливості маркерного профілю ремоделювання міокарда лівого шлуночка щурів в експерименті» наведені результати проведених досліджень маркерного профілю його змін у щурів експериментальних груп при різних за видом та тривалістю впливів. Було проведено порівняльний аналіз результатів впливів гіпоксії та експериментальної артеріальної гіпертензії. Для цього були визначені кількісні дані про експресію та характер розподілу маркерів ремоделювання, таких як кардіотрофін-1, тайтин, колаген I типу та анексин V. Оцінка показників експресії маркерів ремоделювання була здійснена із використанням імунофлюоресцентного методу, кількісними параметрами були вміст і концентрація імунореактивного матеріалу до зазначених маркерів. Для визначення ступеня вираженості фіброзних змін у міокарді було розраховано коефіцієнт тайтин-колагенового співвідношення. У підсумку одержаних результатів можна зазначити, що різні стресорні впливи на міокард, навіть за відсутності клінічно явних проявів, сприяють формуванню його ремоделювання – структурно-функціональних змін компонентів серцевого м'язу у відповідь на гемодинамічні, механічні, нейрогуморальні, запальні та окиснювальні чинники.

Розділ 5. «Особливості стану системи оксиду азоту в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальним ремоделюванням». У представленому розділі наведені результати проведених досліджень стану системи NO в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальним ремоделюванням серцевого м'язу. Для цього було визначені кількісні характеристики експресії та характер ізоформного профілю NOS, а саме нейрональної, індукцйбельної та ендотеліальної NOS за допомогою імунофлюоресцентного методу з визначенням показників вмісту флюоресценції та концентрації імунореактивного матеріалу. Для отримання цілісної картини стану системи NO, встановлення характеру змін та спрямованості процесів метаболізму

газотрансмітерної системи NO було визначено концентрацію мРНК ізоформ NOS. Біохімічним методом з реактивом Гріса визначили концентрацію нітритів у гомогенатах фрагментів міокарда, імуноферментним методом дослідили концентрацію нітротирозину.

Основні результати викладені чітко і логічно, прийнятні для сприйняття, вдало і наочно проілюстровані рисунками. Виявлений ряд важливих у науковому плані фактів, що вирізняються певною новизною.

Розділ 7. У розділі «Аналіз і обговорення результатів дослідження» автор детально і послідовно аналізує отримані дані, співставляючи їх з результатами досліджень, описаних в науковій літературі.

Виходячи з отриманих результатів, дисертант формулює висновки, які повністю витікають із суті роботи і узгоджуються з метою і завданнями дослідження.

Список використаних літературних джерел містить достатню кількість публікацій вітчизняних та закордонних авторів, оформлений коректно та відповідає вимогам ДАК України. Роботу характеризує високий методичний рівень, використання сучасних інформативних методик, системний підхід до статистичного аналізу результатів дослідження. Матеріал у вигляді таблиць і графіків сприяє розумінню значущості змін аналізованих параметрів.

9. Завершеність дисертаційної роботи та зауваження щодо її змісту та оформлення

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням з чітко визначеними та вирішеними метою та завданнями, в якому вірно обрані методологічні та методичні підходи. У виконаній роботі витримана послідовність наукового пошуку з наступним порівняльним аналізом отриманих даних. Отримані результати наукового дослідження слід вважати такими, що не викликають сумнівів.

Зауваження, що виникли при рецензуванні дисертаційної роботи:

- надмірна структуризація роботи;

- невдале або некоректне використання деяких термінів, орфографічні помилки;
- невірне використання одиниць парціального вмісту тиску (с. 79);
- невдале оформлення деяких ілюстрацій;
- розділ аналізу містить рисунки, які частково повторюють дані розділів результатів;
- висновки надмірно деталізовані.

Вказані зауваження не є принциповими та не впливають на наукову і практичну цінність роботи.

У якості дискусії хотілось би отримати відповіді на наступні запитання:

1. Надайте аргументацію, яким чином гіпоксія – типовий патологічний процес – здійснює «фізіологічний» вплив у експериментах? Застосовані в роботі моделі артеріальної гіпертензії у щурів - це «патологічні стани», як їх називає автор, чи патологічні процеси?
2. Чи одержані в роботі результати підтверджують, чи спростовують існування «фізіологічної» гіпертрофії (або ремоделювання) міокарда, описаної переважно у спортивній медицині? З огляду на положення патологічної фізіології поділ на «фізіологічну» і патологічну гіпертрофію не є загальноприйнятим.
3. Чи визначали масу правого і лівого шлуночків серця окремо та відмінності їх ремоделювання при гіпоксії та артеріальній гіпертензії? На відміну від ПГ60, у щурів ПГ15 виявився достовірно вищий показник частки маси серця від маси тіла – як це можна пояснити?

10. Висновок

Дисертаційна робота Ісаченко Марії Ігорівни «Характеристика маркерів ремоделювання міокарда лівого шлуночка і стану системи оксиду азоту при фізіологічних впливах та експериментальних патологічних станах» є закінченим науковим дослідженням у якому вирішено актуальну наукову задачу. Зроблені зауваження не мають принципового значення і не зменшують наукову та практичну цінність роботи.

Таким чином, за актуальністю теми, обсягом, методичним рівнем досліджень, теоретичною і практичною цінністю, науковою новизною результатів, об'єктивністю і обґрунтованістю висновків, повнотою викладення отриманих даних в опублікованих роботах дисертаційна робота Ісаченко М.І. відповідає вимогам, передбаченим п.п. 10, 11 «ПОРЯДКУ проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 року № 167 (зі змінами, внесеними відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України від 21 жовтня 2020 року №979), відносно дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина», а її автор заслуговує на присудження ступеня доктора філософії.

Офіційний опонент:

завідувач відділу гіпоксії

Інституту фізіології

імені О. О. Богомольця НАН України,

доктор медичних наук,

старший науковий співробітник



Портниченко А.Г.

