

ВІДГУК
офіційного опонента доктора медичних наук, професора
Шатила Валерія Броніславовича
на дисертаційну роботу Кондро Мар'яни Миронівни
«Механізми розвитку стеатогепатозу за умов вісцерального ожиріння
різного генезу та його корекція», подану до захисту в спеціалізовану
вчену раду Д.26.551.01 при ДУ «Інститут геронтології ім.
Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.03 – нормальна фізіологія.

1. Актуальність обраної теми.

Однією з особливостей ожиріння як у тварин, так і у людини є дисбаланс активності автономної нервової системи (АНС) у вигляді зниження активності симпатичної нервової системи та підвищення активності парасимпатичної нервової системи, що провокує гормональні та метаболічні зміни, які сприяють надлишковому накопиченню жирової тканини. Вісцеральне ожиріння є безпосередньою загрозою для організму, оскільки є головним проявом метаболічного синдрому з його множинними факторами високого ризику розвитку серцево-судинних захворювань, цукрового діабету 2 типу, злойкісних новоутворень, передчасної смерті. Це гіперінсульніемія та резистентність тканин до інсулулу, дисліпідемія, артеріальна гіпертензія, порушення толерантності до глюкози, ендотеліальна дисфункція, хронічне запалення, порушення гемостазу та ін.

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НЖХП) описується як печінковий прояв метаболічного синдрому. Стеатоз печінки значно підвищує ризики розвитку неалкогольного стеатогепатиту, печінкової недостатності, фіброзу, цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми. Близько 1 млрд. людей у світі страждає від різних форм НЖХП. В науковій літературі навіть з'явився термін печінково-залежна смертність, тобто більш висока смертність хворих з НЖХП та метаболічним синдромом, ніж людей без метаболічного синдрому.

Проблема метаболічного синдрому характерна не тільки для розвинутих країн, але і для країн, що розвиваються, бо більшість аграрних концернів диктують свої умови. Зокрема, в усьому світі широко використовується глутамат натрію, який є підсилювачем смаку у тваринних продуктах харчування

(добавка Е621). З використанням методів генної інженерії стає можливим синтез глутамату натрію і у рослинних організмах, що негативно впливає на стан здоров'я населення.

Дисертаційна робота Кондро М. М. присвячена з'ясуванню механізмів розвитку стеатогепатозу за умов дієт- та глутамат-індукованого ожиріння, а також обґрунтуванню застосування та визначеню ефективності мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований або пробіотика нанокристалічного діоксиду церію для усунення різноманітних порушень, викликаних глутамат-індукованим ожирінням і стеатогепатозом.

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

Дисертаційна робота виконана в межах наукових програм Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького і виконувалась на базі кафедри нормальної фізіології в рамках наукових тем «Дослідження функціонально-метаболічних резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції» (№ д/р 0111U000121) (2012-2016 рр.) та «Дослідження ролі системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостатування функціонально-метаболічних параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи» (№ д/р 0116U004510) (2016-2020 рр.). Дисертаційна робота виконана на базі ЛНМУ імені Данила Галицького та Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, що підтверджено договором про наукове співробітництво та спільними публікаціями. Здобувач брала участь у виконанні цих робіт як виконавець.

3. Ступінь обґрунтованості та достовірності основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Сформульовані Кондро М.М. основні наукові положення та висновки ґрунтуються на використанні адекватних щодо поставлених завдань методів дослідження з дотриманням загальних принципів біоетики у відповідності до Гельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964) та інших міжнародних документів, а також Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006).

Основні наукові положення та висновки обґрунтовані достатньою кількістю експериментальних досліджень, що проводились на білих

нелінійних статевозрілих щурах-самцях із початковою масою 180-200 г, у яких упродовж 18 тижнів моделювали ожиріння висококалорійною дієтою. Для моделювання глутамат-індукованого ожиріння новонародженим білим нелінійним щурятам-самцям підшкірно через день (з 2-го по 10-й день життя) ін'єкційно вводили стандартну дозу глутамату натрію, а потім дослідні і контрольні тварини утримувалися на стандартному кормі «Purina rodent chow» протягом 4 міс. Експериментальну корекцію виявлених порушень проводили водним розчином мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований (140 мг/кг) або нанокристалічним діоксидом церію (1 мг/кг) в період з 1-го по 4-й місяці життя.

Достовірність результатів обґрунтована достатнім обсягом отриманих даних, опрацьованих з використанням сучасних методів статистичної обробки та аналізу. Результати детально проілюстровані та задокументовані.

В роботі використано інформативні сучасні методи досліджень: фізіологічні (моделювання ожиріння, визначення індексу маси тіла та індексу Li, дослідження жовчосекреторної функції печінки, виділення гепатоцитів та фракції внутрішньої мембрани гепатоцитів), біохімічні (визначення в сироваці крові концентрації, глюкози, інсуліну, загального вмісту ліпідів, фосфоліпідів, холестеролу та його ефірів; ферментативної активності комплексів ЕТЛ; параметрів функціонального стану печінки; проведення інсуліно-толерантного тесту), молекулярно-генетичні (дослідження експресії генів), електрофоретичні (визначення вмісту основних фракцій гепатоцитарних білків), хроматографічні (визначення фосфоліпідного складу мітохондріальної мембрани), морфологічні та морфометричні методи, метод еластографії хвилі зсуву за методом SWEI для діагностики експериментальної неалкогольної жирової дистрофії печінки.

Висновки дисертаційної роботи зроблені відповідно до зазначених мети і завдань роботи, сформульовані виключно на підставі отриманих даних, у стисливій формі відображають і підсумовують основні положення роботи.

Таким чином, чітко спланований дизайн дослідження, наявність контрольних груп, достатня кількість тварин к групах, використані високоінформативні методи досліджень, адекватна статистична обробка отриманих даних в сукупності дозволяють оцінити результати наукового дослідження, основні наукові положення як обґрунтовані і достовірні. Висновки і практичні рекомендації цілком аргументовані.

4. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів.

Новизна дослідження полягає у з'ясуванні особливостей серотонінового обміну в тканині мозку, дванадцяталої кишки та у сироватці крові щурів з глутамат-індукованим ожирінням та стеатогепатозом, а також у встановленні корегуючого впливу періодичного застосування мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований або нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на порушені показники серотонінового обміну у цих тварин.

Вперше показано порушення білок-синтезуючої функції печінки у щурів з дієт- та глутамат- індукованим стеатогепатозом та можливість нормалізації цієї функції під впливом застосування мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований або НДЦ.

Отримано докази розвитку мітохондріальної дисфункції у щурів з вісцеральним ожирінням та проявами стеатогепатозу, яка характеризувалась змінами ліпідного складу внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів та ферментативної активності всіх компонентів дихального ланцюга. Виявлені порушення ефективно корегувалась завдяки застосуванню мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований або нанокристалічного діоксиду церію.

Новими є дані щодо суттєвих змін холерезу та жирнокислотного складу жовчі у щурів з дієт- та глутамат- індукованим стеатогепатозом. Застосування мультипробіотика або нанокристалічного діоксиду церію після введення в неонатальному періоді глутамату натрію суттєво відновлювало жовчосекреторну функцію печінки та склад холатів.

Вперше виявлено, що в гепатоцитах щурів за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння суттєво зростають рівні експресії мРНК генів *Tgfb1*, *Ptgs2* та *Hgf*, що свідчить про розвиток фіброзу та запального процесу в печінці. В той же час періодичне застосування мультипробіотика у щурів з глутамат-індукованим ожирінням та стеатогепатозом відновлювало рівень експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* і *Hgf* у гепатоцитах до рівня контролю.

5. Практичне значення одержаних результатів.

На основі отриманих в експерименті даних, зроблених на їх підставі узагальнень та висновків можна рекомендувати проведення доклінічних досліджень нанокристалічного діоксиду кремнію з метою створення нового

препарату для лікування і профілактики стеатогепатозу, викликаного різними етіологічними чинниками.

Результати експериментальних досліджень механізмів профілактично-лікувального впливу мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований є підґрунтям для його більш широкого застосування у пацієнтів з НЖХП та в групі ризику його розвитку.

За результатами дисертаційного дослідження отримано патент на корисну модель «Спосіб профілактики глутамат-індукованого стеатогепатозу за умов експериментального вісцерального ожиріння» та два свідоцтва на раціоналізаторські пропозиції.

Результати дослідження впроваджені у навчальний процес і наукову роботу кількох кафедр вищих медичних навчальних закладів України.

Використання мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрованого як засобу профілактики стеатогепатозу впроваджено у лікувальний процес КНП ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні, КНП ЛОР Львівської обласної дитячої клінічної лікарні «Охматдит» та КНП ЛОР Львівської обласної інфекційної клінічної лікарні.

6. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій і опублікованих працях та в авторефераті.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 53 наукові праці, у тому числі 27 статей (15 – у наукових фахових виданнях України, 8 – у наукових періодичних виданнях інших держав, включених до наукометричних баз даних (серед них 7 – у журналах, включених до наукометричної бази Scopus), 4 – в інших наукових виданнях України) та 23 тези доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, симпозіумів та конгресів, 1 патент на корисну модель та 2 свідоцтва на раціоналізаторську пропозицію.

Текст автореферату аутентичний тексту дисертаційної роботи. В авторефераті автором чітко, послідовно у лаконічній формі викладені основні положення, висновки та результати дослідження. Автореферат дисертації оформлений згідно вимог ДАК України.

Матеріали дисертаційної роботи Кондро М. М. пройшли апробацію на міжнародних та всеукраїнських конференціях, конгресах.

Матеріали кандидатської дисертації не використовувалися при написанні докторської.

7. Структура дисертації.

Матеріали дисертації викладені на 385 сторінках друкованого тексту, з них 75 сторінок списку використаних літературних джерел. Дисертація включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, результати власних досліджень, узагальнення, висновки та список використаних джерел із 680 найменувань. Робота ілюстрована 50 таблицями та 95 рисунками.

У вступі Кондро М. М. розкриває сутність наукової проблеми та її значення для медицини, підстави та вихідні дані для розробки обраної теми, обґрунтовує необхідність, доцільність та важливість проведення досліджень, які поглиблюють уявлення про механізми розвитку стеатогепатозу різного генезу. Літературний огляд містить критичний аналіз сучасної літератури та вибір напрямку дисертаційної роботи.

У другому розділі «Матеріали та методи дослідження» наведений методичний підхід при проведенні досліджень з описом використаних методів досліджень, які є апробованими, сучасними та адекватними поставленій меті та завданням досліджень. Був застосований комплекс методик - фізіологічні, біохімічні, молекулярні, біофізичні, імунохімічні, гістоморфологічні та морфометричні, методи математичної статистики, які дозволили отримати обґрунтовані результати. Кількість використаних тварин у групах достатня для отримання статистично достовірних результатів. Експерименти проведені на щурах, які розділені на 4 групи залежно від моделі ожиріння та застосованого коректора – мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований чи нанокристалічного діоксиду церію.

Результати експериментальних досліджень автора логічно та послідовно викладені у чотирьох розділах.

У Розділі 3 «Механізми розвитку стеатогепатозу за умов вісцерального ожиріння, викликаного високо-калорійною дієтою» Кондро М. М. стверджує, що за умов розвитку дієт-індукованого стеатогепатозу на тлі вісцерального ожиріння змінюються антропометричні показники щурів, активність цитолітичних ферментів в сироватці крові, збільшується вміст загального білірубіну та кон'югованого білірубіну, зростає тимолова проба, розвивається дисліпопротеїнемія з одночасним зростанням атерогенних ліпопротеїнів низької щільності, змінюються ферментативна активність компонентів ЕТЛ мітохондрій гепатоцитів, показники системи метаболізму серотоніну та

ліпідного складу внутрішньої мітохондріальної мембрани, цитоплазматичних білків гепатоцитів, зменшується маса селезінки та кількість спленоцитів, що спричиняє дисбаланс вмісту про- та протизапальних цитокінів у сироватці крові, збільшується холерез та суттєво змінюється жирнокислотний склад жовчі.

У Розділі 4 «Механізми розвитку стеатогепатозу за умов вісцерального ожиріння, викликаного неонатальним введенням глутамату натрію» показано, що за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння відбувається активація кінуренінового шляху метаболізму триптофану в тканині мозку, що є характерним для низки патологічних процесів, за яких зменшується вміст серотоніну. Визначено односторонність змін концентрації серотоніну та триптофану, а також показників його обміну в тканині мозку і сироватці крові. Показано, що у щурів із глутамат-індукованим ожирінням та стеатогепатозом відбуваються суттєві структурні зміни внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів, зокрема їх ліпідного складу, також знижується ферментативна активність всіх компонентів ЕТЛ та Н⁺-АТФази активність. У щурів після неонатального введення глутамату натрію на тлі розвитку вісцерального ожиріння та стеатогепатозу зменшується маса селезінки та кількість спленоцитів, що спричиняє дисфункцію імунної системи, одним із проявів якої є дисбаланс вмісту про- та протизапальних цитокінів у сироватці крові. Крім того, у тварин зменшується холерез та суттєво змінюється спектр холатів в жовчі: концентрація вільних жовчних кислот зростала та зменшувалась концентрація кон'югованих жирних кислот, що знайшло своє підтвердження у суттєвому зменшенні коефіцієнта кон'югації жовчних кислот. Встановлено зростання рівнів експресії мРНК генів *Tgfb1*, *Ptgs2* та *Hgf* в гепатоцитах щурів за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння.

Розділ 5 «Мультипробіотик «Симбітер ацидофільний» концентрований як засіб корекції стеатогепатозу, індукованого глутаматом натрію» обґрунтовує доцільність застосування мультипробіотика для профілактики та лікування стеатогепатозу, викликаного вісцеральним ожирінням.

Розділ 6 «Нанокристалічний діоксид церію як засіб корекції стеатогепатозу, індукованого глутаматом натрію» доводить ефективність наноцерію для попередження розвитку стеатогепатозу, спричиненого введенням глутамату натрію у неонатальному періоді життя.

У розділі 7 «Заключення» Кондро М. М. підводить підсумок важливої за змістом науково-дослідної роботи, а саме, підкреслює роль механізмів

розвитку стеатогепатозу за умов вісцерального ожиріння різного генезу в експерименті та можливість експериментальної корекції виявлених порушень мультипробіотиком та наноцерієм.

Сформульовані висновки повністю відображають результати власних досліджень і випливають із представленого фактичного матеріалу.

Після знайомства з дисертаційною роботою виникли деякі зауваження/побажання:

1. Кількість висновків після кожного розділу власних даних можна скоротити до найбільш важливих. Після кожного розділу власних даних надати перелік опублікованих праць, в яких дисертант висвітлив ці дані.

2. В розділі 2 вважаю доцільним вказати загальну кількість тварин, взятих в експеримент по моделюванню дієто-індукованого ожиріння. Потребує уточнення скільки тварин використано для тих чи інших методик досліджень на різних етапах експерименту як з дієт-індукованим ожирінням (через 3, 6, 9, 12, 15 та 18 міс), так і в експерименті з глутамат-індукованим ожирінням.

3. Схеми застосування мультипробіотика і нанокристалічного діоксиду кремнію, викладені у таблиці 2.1. потребують пояснення: фраза «2-х тижневе курсове введення упродовж 3-х місяців після 1 місяця життя» не дає відповіді на питання чи був це один курс чи їх було декілька протягом 3-х місяців, чи починалось застосування засобів корекції рівно через 1 місяць після народження чи пізніше.

4. У розділі 2 говориться, що дослідження у тварин проводились через 3, 6, 9, 12, 15 та 18 тижнів застосування ВКД. Проте при аналізі даних розділу 3 стає очевидним, що дослідження жовчосекреторної функції проводилось через 20 тижнів експерименту із ВКД; інсуліно-толерантний тест проводився згідно таблиці 3.7 через 7 та 14 тижнів експерименту; показники ферментативної активності компонентів ЕТЛ визначались через 20 тижнів експерименту (згідно рисунків 3.12-3.16); цитоморфологічний стан селезінки досліджено через 10 тижнів застосування ВКД (це вказано у відповідній таблиці розділу 3). Це краще було б описати у методичній частині роботи.

Дискусійні запитання:

1. Чим обумовлений вибір визначення показників серотонінової системи у дванадцятипалій кишці за умов розвитку глутамат-індукованого стеатогепатозу?
2. Як поясните зростання вмісту ліпідів та триацилгліцеролів у цитоплазмі гепатоцитів при розвитку глутамат-індукованого ожиріння?
3. Застосування мультипробіотика або нанокристалічного діоксиду церію у тварин із глутамат-індукованим ожирінням і стеатогепатозом призводить до нормалізації ферментативної активності дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів. Які спільні механізми ефективної корекції порушень при застосуванні цих засобів?
4. Рекомендації щодо практичного застосування мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований та нанокристалічного діоксиду кремнію, що випливають із результатів Вашого дослідження.

Викладені зауваження та запитання не носять принципового характеру, не понижують позитивної оцінки дисертації у цілому, а також розроблених автором основних наукових положень, висновків та одержаних результатів проведених досліджень.

Висновок

Дисертаційна робота Кондро Мар'яни Миронівни «Механізми розвитку стеатогепатозу за умов вісцерального ожиріння різного генезу та його корекція», що подана для офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук в спеціалізовану вчену раду Д.26.551.01 при ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», є самостійною завершеною науково-дослідною працею. Вона містить отримані автором принципово нові наукові результати, які у сукупності вирішують важливу науково-практичну проблему – розкривають механізми розвитку стеатогепатозу за умов вісцерального ожиріння та експериментально обґрунтують застосування мультипробіотико- та нанотерапії для корекції виявлених порушень.

Дисертаційна робота Кондро М. М. «Механізмах розвитку стеатогепатозу за умов вісцерального ожиріння різного генезу та його корекція» за актуальністю теми, науковою новизною отриманих результатів, їх науково-практичним значенням відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від

24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.) щодо докторських дисертацій, а її автор заслуговує наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю нормальна фізіологія - 14.03.03.

Заступник директора з наукової роботи,
завідувач відділу клінічної фізіології
і патології внутрішніх органів
ДУ «Інститут геронтології
ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»
доктор медичних наук, професор



Шатило В. Б.

