

Голові спеціалізованої вченої ради з розгляду та захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії, Галкіну Борису Миколайовичу, доктору біологічних наук, професору кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології, директору біотехнологічного науково-навчального центру ОНУ імені І. І. Мечникова.

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, проректора з наукової роботи Київського національного університету імені Тараса Шевченка Толстанової Ганни Миколаївна

на дисертаційну роботу Косенко Тетяни Василівни «Роль дисбіозу у розвитку печінкової остеодистрофії », представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми

Представлене дисертаційне дослідження направлене на з'ясування патогенетичного взаємозв'язку трикутника печінка-травний тракт – кісткова тканина. Актуальність дослідження цього взаємозв'язку обумовлена доволі низькою ефективністю лікування печінкової остеодистрофії, що свідчить про недостатність знання механізмів розвитку даної патології. Підставою для формулювання гіпотези дослідження стали дані наукової літератури про взаємозв'язок між порушенням антимікробної функції печінки та розвитком дисбіотичних змін в кишечнику. Розвиток дисбіоз-асоційованого запалення може зумовлювати порушення всмоктування макро- і мікроелементів, жиророзчинних вітамінів (А, D, Е, К), та, теоретично, бути чинником розвитку дистрофії кісткової тканини.

Наразі природа взаємозв'язку ремоделювання кісткової тканини із розладами у кишечнику, які були ініційовані гепатобіліарною патологією потребує додатково дослідження. З'ясуванню цього взаємозв'язку та його уніфікованості в незалежності від природи печінкової патології присвячена представлене дисертаційне дослідження.

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

Робота виконана на кафедрі фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, в рамках НДР № держ. реєстрації 0119U000499 «Дослідження лікувально-профілактичних властивостей раковин молюсків Чорного моря» та ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої

хірургії НАМН України» в рамках НДР № держ. реєстрації 0120U105477 «Експериментальне дослідження змін тканин ротової порожнини у щурів під впливом ксенобіотиків та гіпоксії».

Оцінка структури, змісту та форми дисертації

Дисертаційна робота включає наступні розділи: анотація, вступ, чотири розділи (огляд літератури, матеріали та методи дослідження та два розділи з результатами власних досліджень та їх обговоренням), узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел, практичні рекомендації та додатки. В додатках наведено список публікацій, а також два висновки санітарно-епідеміологічної експертизи на профілактичні комплекси, які були використані в дослідженні. Всі розділи дисертації взаємопов'язані між собою, про що свідчить послідовність викладених матеріалів.

Слід відзначити, що назва дисертаційної роботи доволі однобічно відповідає змісту дисертаційного дослідження. В назві основний акцент зроблено на «роль мікробіоти», точніше їх розладів у вигляді дисбіозу. Проте в роботі лише побічно досліджено дисбіоз. Навпаки, дослідження є більш масштабними і торкають ширше коло питань пов'язаних з функціональним внеском кишечника в розвиток печінкової остеодистрофії. Більш доцільним було б назвати дисертаційне дослідження не «Роль дисбіозу у розвитку печінкової остеодистрофії», а «Функціональний внесок кишечника в розвиток печінкової остеодистрофії».

У розділі «Вступ» висвітлені загальні положення дисертаційної роботи, вказані мета, завдання, подана інформація про наукову новизну і практичне значення результатів, зазначений зв'язок роботи з науковими програмами, темами, а також вказані публікації і праці апробаційного характеру. Проте, неадекватне визначення назви дисертаційного дослідження знаходить свої наслідки в меті дослідження яке звучить «Експериментальне дослідження ролі дисбіозу у розвитку остеодистрофії у лабораторних щурів з гепатобіліарною патологією....». В роботі напряду не було досліджено роль дисбіозу, про що свідчать б завдань дисертаційного дослідження. Авторка дисертаційного дослідження самостійно, в узагальненні до розділу «Огляд літератури», визначає мету власного дослідження «Робота спрямована на вивчення природи взаємозв'язку патогенезу ремоделювання кісткової тканини із розладами у кишечнику, які були ініційовані гепатобіліарною патологією, які наразі залишаються недокінця з'ясованою». Що повністю відображає зміст експериментальної роботи і було б ідеальною метою. Виникає відчуття, що назва дисертаційного дослідження потребувала уточнення від назви, яка мабуть була визначена на початку, при вступі до аспірантури. Тому, варто, аналізувати новизну і практичне значення отриманих результатів, без урахування не достатньо влучної назви і відповідно мети.

У розділі 1 «Огляд літератури» здобувачем наведено найбільш актуальні літературні дані за темою дисертаційного дослідження, зокрема до аналізу залучені переважно джерела за останні 5 років. Зокрема, висвітлені питання щодо сучасних відомостей про патогенез розвитку остеодистрофії при гепатобіліарних захворюваннях. Також детально охарактеризовано головні фактори ризику патології, зокрема: порушення метаболізму та абсорбції вітамінів К і D, дефіцит жовчних кислот

у кишечнику, гіпербілірубінемію та розлади метаболізму статевих гормонів у печінці. Огляд літератури вдало побудований, логічно спрямовує читача до розуміння необхідності вивчення питання дисертаційного дослідження, а саме ролі кишечника у патогенезі печінкової остеодистрофії. Слід відзначити що кожний підрозділ огляду літератури завершується узагальнюючим абзацом, який обґрунтовує логіку наступного пункту чи підрозділу.

В розділі 2 «Матеріали і методи» достатньо детально наведена схема експерименту, та опис методології. Зокрема, для реалізації поставлених завдань було використано патофізіологічні; біохімічні (визначення маркерів запалення, дисбіозу, ремоделювання кісткової тканини); фізіологічні (всмоктування, виведення та засвоєння кальцію, проникність стінки тонкої кишки); морфологічні (визначення атрофії альвеолярного відростку щелеп, щільності, вмісту мінерально-органічного компоненту кісток); гістологічні; статистичний аналіз результатів. Робота виконана на лабораторних білих щурах самцях, а також щурах лінії Wistar обох статей, які знаходились в стандартних умовах віварію ОНУ імені І. І. Мечникова, у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та з урахуванням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

У розділі 3 досліджували стан слизових оболонок кишечника щурів після відтворення токсичного гідразинового гепатиту та рівень абсорбції кальцію, проникність стінок кишечника, морфометричні та біохімічні показники стану кісткової тканини у щурів з хронічним токсичним гепатитом. Зокрема встановлено, що за умов гідразинового гепатиту порушується засвоєння Ca^{2+} , переважно за рахунок зменшення його всмоктування з кишечника, проте не відбувалося змін у рівні всмоктування ароматичних амінокислот. Окремою родзинкою цього розділу є порівняльні дослідження стану різних кісток самок та самців щурів, яким моделювали хронічний токсичний гепатит на протязі трьох місяців: стану зубощелепної системи; ступінь атрофії альвеолярного відростку нижньої щелепи; щільність стегнових, великих гомілкових кісток, поперекових хребців, а також окремо епіфізу та діафізу стегнових кісток щурів та визначення мінеральної та органічної частини кісткової тканин поперекових хребців, великих гомілкових кісток та діафізу стегнової кістки тварин. Встановлено, що введення розчину сірчаноокислого гідразину двічі на тиждень протягом трьох місяців викликало різноспрямовані процеси у кістковій тканині самок та самців щурів.

В розділі 4 на моделі хронічного холестазу, шляхом перев'язки жовчної протоки щурів самців, по-перше доведено, уніфікованість змін в кишечнику і кістковій тканині до даних отриманих на моделі токсичного гідразинового гепатиту. Також, експериментально обґрунтовано ефективність профілактики порушень у кістковій та травній системі за введення гепатопротектору, який містить лецитин, кверцетин, інулін, кальцій, аскорбінову кислоту та володіє гепатопротекторними, антидисбіотичними та протизапальними властивостями, а також сорбенту. Зокрема, авторкою анонсовано, що профілактика сумісним введенням гепатопротектора і сорбента дозволила значно покращити стан кісткової тканини за рахунок компонентів,

що входять до складу: лецитину і кверцетину, які проявляють гепатопротекторні, антиоксидантні, протизапальні та жовчорозріджувальні властивості; інуліну, який володіє антидисбіотичною дією; кальцію і аскорбінової кислоти, які впливають на міцність кісткової тканини.

Слід відзначити, що кожний експериментальний розділ завершується описовим узагальненням, що дозволяє систематизувати отримані дані.

У розділі «Узагальнення» стисло викладено основні результати дослідження, що узгоджуються з даними інших дослідників та, відповідно, містять посилання на літературні джерела. Слід відзначити, що авторка в цьому розділі застосовує додаткові аналітичні підходи з метою кластеризації отриманих експериментальних даних, а також наводить графічний «абстракт», який виконує функцію візуального узагальнювального висновку.

Розділ «Висновки» містить сім чітко сформульованих, структурованих висновків, узгоджених з отриманими результатами досліджень. Загальний обсяг дисертації складає 181 сторінок, в ній представлено 20 рисунків і 37 таблиць. Перелік використаних джерел містить 200 найменувань (106 кирилицею і 94 латиницею).

Наукова новизна отриманих результатів

Серед основних моментів новизни проведених досліджень є комплексне вивчення функціонального взаємозв'язку трикутника «печінка – травний тракт – остеогенез (стан кісткової тканини)». Зокрема, доведено уніфікованість функціональних розладів взаємозв'язків у трикутнику, в незалежності від механізму розвитку патології печінки (в роботі порівнювалися показники трьох різних моделей печінкової патології).

Також, важливим аспектом є дані порівняльних досліджень на самках і самцях щодо перебігу експериментальної печінкової остеодистрофії і залученості різних відділів травного тракту до нього. Встановлено, що самці є більш схильними до розвитку даної патології, що підтверджується статистично обґрунтованими експериментальними даними.

Практичне значення отриманих результатів

В роботі, експериментально обґрунтовано застосування, в якості профілактичного лікування розвитку печінкової остеодистрофії двох комплексних препаратів, гепатопротектора та сорбенту.

Повнота викладу наукових положень, висновків, рекомендацій в опублікованих працях

За результатами дисертації опубліковано 14 наукових праць: 6 статей у наукових фахових виданнях України, 7 тез у матеріалах конференцій, 1 довідник у співавторстві.

Відповідність теми дисертації профілю спеціальності

Дисертація Косенко Т. В. відповідає стандарту спеціальності 091 «Біологія», галузі знань 09 «Біологія».

Відсутність порушення академічної доброчесності

Не виявлено підстав для сумнівів у науковій доброчесності здобувача під час ознайомлення з дисертаційною роботою.

Зауваження до автора дисертації в межах наукової дискусії:

Зауваження критичного характеру:

Єдиним критичним зауваженням є те, що назва роботи і поставлена мета до кінця не відповідають змісту дисертаційного дослідження. В дисертаційному дослідженні вивчено стан всмоктувальної функції кишечника щурів на тлі про-запальних змін обумовлених експериментальною патологією печінки. І як результат обґрунтовано один із механізмів розвитку печінкової остеодистрофії опосередкований порушенням всмоктування Ca^{2+} і генералізованим розвитком запалення на фоні, скоріше за все, бактеріального обсіменіння. В роботі не досліджувалася роль дисбіозу, а констатувався його розвиток за рівнем співвідношенням між уреазною активністю та амілазною на тлі патології печінки.

Зауваження рекомендаційного характеру:

1. Мені здається робота б виглядала більш структурованою і логічною, якщо б вона починалася з викладу експериментальних даних по оцінці патогенетичних взаємозв'язків трикутника печінка-травний тракт-кісткова тканина за умов експериментально-викликаного токсичного гепатиту та хронічного холестазу у щурів, тим паче, що дані дослідження проведені на однаковій лінії лабораторних щурів і майже одного віку. Наступним етапом, дослідити особливості патогенетичних взаємозв'язків трикутника печінка-травний тракт-кісткова тканина у самців і самок, ця серія експериментів, на мою думку є найціннішою, з точки зору наукової новизни дисертаційного дослідження і стоїть окремо, т.я. проведена на відмінній від попередніх досліджень лінії щурів, також токсичний гепатит був викликаний за іншою ніж на попередньому етапі схемою введення сірчаноокислого гідразину. Наостанок, показати ефект профілактичного введення досліджуваного комплексу в попередженні патогенетичного взаємозв'язків трикутника печінка-травний тракт-кісткова тканина.

2. Серед обмежень представленого дисертаційного дослідження, які варто було б врахувати при розробці дизайну експерименту є наступне:

2.1. визначення ступіня дисбіозу, а також висновок про ріст патогенної чи сапрофітної мікробіоти за співвідношенням активності уреазы і лізоциму в слизовій оболонці тонкої і товстої кишок є доволі відносним. В роботі відсутні мікробіологічні дослідження.

2.2. не до кінця зрозуміло із тексту дисертації чому дослідження в 1, 2 і 3 етапах виконані на різних за віком тваринах, чим це було обумовлено? Адже 1 етап на щурах 10 місячних, масою 335 г. 2 етап на щурах 1 міс 65 г., 3 етап на щурах віком 7-8 міс масою 170-180 г. Тим паче, що термін виведення тварин із експерименту становить 3 (для 1 і 2 етапів) і 4 місяці (для 3 етап) від початку індукування патології.

2.3. відсутність порівняння ефектів окремо препарату з гепатопротекторною дією і сорбенту з ефектом комплексного введення двох препаратів для попередження патології кісткової тканини за умов хронічного холестазу.

2.4. не дивлячись на доведену різницю в перебігу експериментально-викликаної печінкової остеодинтрофії у самок і самців, потребує додаткового обґрунтування чому дослідження профілактичних засобів було проведено лише на самцях.

2.5. для експериментального підтвердження ролі саме дисбіозу в розвитку печінкової остеодинтрофії, варто було б, перед моделювання патології печінки викликати дисбіоз, наприклад введенням антибіотиків і відповідно порівняти: 1 - інтактні, 2 - дисбіоз, 3 - патологія печінки, 4 - дисбіоз+патологія печінки. Також, як альтернативу, можна було в якості профілактики використати пробіотичний препарат на тлі експериментальної печінкової остеодинтрофії.

Зауваження технічного характеру:

1. На мою думку завдання 1 і 2 дисертаційного дослідження доволі подібно сформульовані: Завдання 1. Встановити *стан слизових оболонок* тонкої кишки у щурів за умов моделювання токсичного гепатиту шляхом введення гідразинсульфату; Завдання 2. Дослідити *стан слизових оболонок* кишечника у самок та самців щурів з хронічним токсичним гепатитом за показниками всмоктування, засвоєння кальцію та амінокислот, проникності епітелію стінки тонкої кишки, запалення, ступеня дисбіозу. Якщо ж авторка хотіла підкреслити «родзинку» своєї дисертації, було б варто в Завданні 2, зробити наголос на «Порівняти стан слизових оболонок кишечника у самок та самців щурів з хронічним токсичним гепатитом ...», т.я. необхідність дослідження «стану», вже визначено Завданням 1.

2. В матеріалах і методах не до кінця зрозуміло, як були сформовані групи для проведення порівняльних досліджень із залученням самок і самців, зокрема в матеріалах і методах вказано, що «Досліджували засвоєння і виділення кальцію у щурів за допомогою метаболічних камер. Для цього було відібрано 9 тварин, з яких 3 були з контрольної групи і 6 тварин із змодельованим токсичним гепатитом» Я так розумію, що 6 дослідна група – це 3 самки+3 самці, тоді не зрозуміло, як 3 щура можуть бути поділені для обґрунтованих висновків щодо гендерної диверсифікації отриманих результатів?

3. В таблиці 3.10 «Показники активності еластази, кислої фосфатази та вмісту малонового діальдегіду в гомогенатах печінки щурів, яким моделювали токсичний гепатит» не наведені порівняльні дані щодо показників у самок і самців, а надані усереднені значення, хоча по тексту йде порівняння показників між самками і самцями і посилання на відповідну таблицю.

4. Рис. 3.2 «Проникність ізольованої ділянки тонкої кишки у щурів з хронічним токсичним гепатитом, мкг/мл фарби Еванса» – відсутні показники статистичної значущості між вимірюваними параметрами.

5. Логічним було б об'єднати дані таблиць 3.7. і 3.8. «Склад периферичної крові щурів з хронічним гепатитом», для полегшення порівняння різниці в досліджуваних показниках між самкою і самцями.
6. В розділі 4 було б більш доцільним об'єднати представленні гістологічні зрізи у групи порівняння на одному рисунку, що полегшило б сприйняття описаних змін у стані кісткової тканини та ефекту профілактичного лікування.
7. По тексту зустрічаються невдалі вирази, зокрема: (1) «стану *головного відділу травного тракту*, в якому відбувається всмоктування поживних речовин – *слизової оболонки тонкої кишки* у щурів ..» (слизова оболонка - не є відділом травного тракту); (2) «*Проведення профілактики ефективно* попереджувало встановлені зміни у печінці та сироватці крові щурів з холестазом, а також *сприяло збереженню показників запалення*, антимікробного та антиоксидантного захисту, ступеня контамінації умовно-патогенними бактеріями та дисбіозу у травному тракті щурів на нормальному рівні» (дане твердження має неоднозначне сприйняття).
8. Також по тексту зустрічаються орфографічні і стилістичні помилки.

Питання до автора дисертації в межах наукової дискусії:

1. Чи є данні літератури про розвиток печінкової остеодисрофії, що передувало розвитком дисбіозу. Наприклад, як віддаленні наслідки застосування антибіотикотерапії тощо.
2. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за методом t-test Стьюдента, який застосовується за умов нормального розподілу. Як визначали чи був нормальний розподіл отриманих експериментальних даних, а також яка мінімальна була вибірка для отримання значущості результатів $p < 0.05$?
3. В роботі матеріалах і методах зазначено, що для досліджень було використано 20 см тонкої чи товстої кишки. Чи можна надати більш детальну інформацію який саме відділ тонкої кишки було використано? Яким чином було уніфіковано використання аналогічної ділянки у всіх досліджуваних тварин?
4. В аналізі отриманих результатів дослідження авторка часто посилається на зниження антимікробної функції печінки, як причини виявлених змін у співвідношенні уреазі і лізоцима в слизовій оболонці тонкої кишки, що трактується як показник дизбіотичних змін і збільшення кількості патогенної мікробіоти. За яким методом було визначено рівень антимікробної функції печінки. Потребує додаткового обґрунтування ферментативної оцінки ступеня дисбіозу.
5. Проведене дослідження встановило недостатність засвоєння кальцію у травному тракті щурів з хронічним гепатитом. Як це може бути пояснено, т.б. який механізм лежить в основі?
6. В представлених дослідження вимірювали зміни у рівні всмоктування суміші ароматичних амінокислот (фенілаланін, тирозин, триптофан) у ділянці порожнистої кишки. Змін не встановлено. Чому саме обрано суміш ароматичних, а не інших амінокислот? І чи можна, на думку авторки, говорити про відсутність змін у рівні всмоктуванні АК, лише за рівнем всмоктування ароматичних АК?

Водночас, висловлені дискусійні питання в основному мають рекомендаційний характер і не знижують загалом високого рівня представленого дисертаційного дослідження.

Загальний висновок та оцінка дисертації.

Дисертаційне дослідження Косенко Т.В. на тему: «Роль дисбіозу у розвитку печінкової остеодистрофії» є самостійним, завершеним науковим дослідженням, що відповідає вимогам, а зазначені дискусійні питання не зменшують наукову цінність представлені роботи. На підставі викладеного, можна зробити висновок, що дисертаційне дослідження на тему: «Роль дисбіозу у розвитку печінкової остеодистрофії», що подане на здобуття наукового ступеня доктора філософії, відповідає спеціальності 091 «Біологія», Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44 та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 (із змінами, внесеними згідно з наказом Міністерства освіти і науки від 31 травня 2019 року № 759), відповідно її авторка – Косенко Тетяна Василівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент – доктор біологічних наук, професор, проректор з наукової роботи Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Ганна ТОЛСТАНОВА

