

ВІДЗИВ

Офіційного опонента на дисертаційну роботу Баріляка Романа Володимировича на тему «Особливості функціонування Ca^{2+} -залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника», поданої на здобуття наукового ступеня доктора філософії у разову спеціалізовану вчену раду ДФ 35.600.018 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького за спеціальністю 222 Медицина, галузь знань 22 Охорона здоров'я

Актуальність теми дисертаційної роботи

Рак яєчника відноситься до тяжкої патології жіночої репродуктивної системи, яка широко вивчається з метою удосконалення методів діагностики, виявлення пухлинного процесу на ранніх стадіях і лікування. Це захворювання широко розповсюджене в усіх країнах світу і в Україні, зокрема і супроводжується високою смертністю.

Проблема вивчення біохімічних змін, зокрема регуляторних систем клітини, пошук біохімічних маркерів і діагностики рака яєчників залишається однією з актуальних задач сучасної біохімії, онкогінекології та й медицини в цілому.

В цьому аспекті, звертає на себе увагу вивчення ролі таких універсальних внутрішньоклітинних месенджерів як оксид азоту (NO) та іонізований кальцій (Ca^{2+}) в проліферації та диференціації клітин і пухлинному рості, а також активних форм кисню (АФК), що спричиняють оксидативний стрес і порушують про-антиоксидантну рівновагу. Наявні окремі дані, що NO та його метаболіти в залежності від концентрації чи внутрішньоклітинної локалізації можуть проявляти проліферативні або антипроліферативні ефекти.

Оскільки синтез NO здійснюється з L-аргініну за участі конститутивних та індукцибельної ізоформ NO-синтази і L-аргінін, окрім того, метаболізується за участю аргінази, актуальним є вивчення каталітичних властивостей даних ензимів за умов захворювання.

Щодо регуляторної ролі іонізованого кальцію, то відомо, що будь-які зміни його внутрішньоклітинної концентрації призводять до порушень функціонування клітин. Важливими ензимами, що регулюють концентрацію Ca^{2+} в клітині є $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму. Їх роль в проліферативних процесах клітини з'ясована недостатньо.

Важливу роль в порушенні проліферативних процесів клітини також може відігравати оксидативний стрес та антиоксидантний захист.

З метою вивчення біохімічних змін, що відбуваються в організмі при розвитку рака яєчника, найбільш адекватною моделлю можуть слугувати лімфоцити периферичної крові, які вважаються «метаболічним дзеркалом» організму, швидко, як і нервова система, реагують на різноманітні зовнішні та внутрішні впливи і здатні об'єктивно відображати зміни генетичного та метаболічного гомеостазу організму.

Отже, хоча існує велика кількість досліджень щодо вивчення біохімічних процесів, що відбуваються в клітинах при їх злоякісній трансформації, видається актуальним вивчення аргіназо-NO-синтазного шляху метаболізму аргініну, активності іон-транспортувальних систем, системи антиоксидантного захисту, а також маркерів проліферативних процесів, порушення функціонування яких може спричинити розвиток патологічних станів.

Таким чином, представлена на рецензію дисертаційна робота Бариліака Р.В. на тему «Особливості функціонування Ca^{2+} -залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника» є актуальною як в фундаментальному, так і в прикладному аспектах, і має суттєве значення для охорони здоров'я.

Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами

Опонована робота є фрагментом планової науково-дослідної теми Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

"Дослідження ролі системних і паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостатування функціонально-метаболических параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи», державний реєстраційний № 0116U004510 (2016-2020 рр.), що виконувалась кафедрою медичної біології, паразитології та генетики. Автор є співвиконавцем згаданої теми, ним особисто проведені лабораторні дослідження, представлені у дисертаційній роботі. Тема дисертації затверджена вченою радою медичного факультету № 2 (протокол № 3 від 21.11.2018 р.).

Комісією з питань біоетичної експертизи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 25 лютого 2019 р. та протокол № 1 від 25 січня 2021 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявлено.

Загальні відомості про роботу

Основний текст дисертація викладений на 157 сторінках друкованого тексту та включає анотацію українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, власні дослідження, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки, додатки. Дисертація ілюстрована 23 рисунками та 9 таблицями.

Характеристика змісту роботи

Робота написана за загальноприйнятим планом і складається з наступних розділів: вступу, розділу 1 (огляд літератури, що складається з 6 підрозділів), розділу 2 (матеріали та методи дослідження), трьох розділів експериментальних даних, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків, списоку використаних джерел.

Вступ відображає актуальність, новизну роботи, зв'язок із темою планового наукового дослідження. В ньому обґрунтовується необхідність вивчення регуляторних систем клітини і патохімічної ролі оксиду азоту та іонізованого кальцію. Мета і задачі дослідження поставлені чітко. У розділі відображена апробація роботи на міжнародних і всеукраїнських наукових конференціях.

Розділ 1. Огляд літератури. В ньому наведені дані про особливості функціонування яєчника, гормональні зміни при канцерогенезі, маркери рака яєчника, роль про- та антиоксидантної, Ca^{2+} -залежної АТФ-гідролазної та аргіназо-NO-синтазної систем у злоякісній трансформації клітин. Значна увага надається лімфоцитам як однієї з інтегральних систем організму, що дуже швидко реагує на будь-які впливи, а стан імунологічної реактивності сьогодні розглядається як один з ранніх і чутливих критеріїв несприятливого впливу шкідливих чинників екзо- та ендогенного походження.

Розділ "Матеріали і методи досліджень" включає опис 14 методів. В ньому наведені дані про розподіл жінок хворих на рак яєчника на групи в залежності від стадії розвитку рака яєчника. Детально описані біохімічні методи досліджень, статистична обробка отриманих результатів.

Три розділи власних досліджень, включають підрозділи, з отриманими даними щодо вікових особливостей концентрації пухлинного маркера СА-125 у практично здорових жінок і жінок хворих на РЯ, стану про- та антиоксидантної системи, стану аргіназо-NO-синтазної та Ca^{2+} -залежної АТФ-гідролізної систем. Розділи написані завершуються проміжними висновками щодо отриманих результатів. У заключній частинах розділів наведені списки власних публікацій за матеріалами дисертаційної роботи.

У розділі „Аналіз і узагальнення результатів досліджень“ детально наведено аналіз отриманих результатів, обґрунтовані узагальнення, які лягли в основу сформульованих висновків дисертації.

Висновки роботи є аргументованими і повністю впливають з отриманих експериментальних даних.

Список використаних джерел складає 221 посилання і оформлений у відповідності з існуючими вимогами.

Новизна досліджень та отриманих результатів

Виявлені особливості ензиматичних активностей і кінетичні параметри аргінази, окремих ізоформ NO-синтази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз плазматичної

мембрани та ендоплазматичного ретикулуму, ензимів системи глутатіону лімфоцитів периферичної крові жінок хворих на рак яєчника.

Показане зростання концентрації агнітигена СА-125, що є маркером розвитку рака яєчника, зі зростання стадії захворювання.

Виявлено, що під час розвитку злоякісної трансформації яєчника в лімфоцитах крові відбувається зростання активності аргінази (за рахунок збільшення числа обертів ензиму), зниження активності конститутивної ізоформи NO-синтази та багатократне зростання активності індукбельної ізоформи NO-синтази, що свідчить гіперпродукцією оксиду азоту. На основі кінетичного аналізу з'ясовано, що зростання активності iNOS відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму та зростання його спорідненості до аргініну.

Виявлено зниження ензиматичних активностей Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-залежних транспортувальних систем плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулумі лімфоцитів крові пацієнтів із раком яєчника, що ймовірно призводить до перевантаження клітин Ca^{2+} . Вперше встановлено механізми дисфункції досліджуваних АТФазних систем лімфоцитів крові пацієнтів хворих на рак яєчника, які полягають у зменшенні числа обертів ензимів та зниженні їх афінності до субстрату.

Результати проведених досліджень розкривають раніше невідомі біохімічні та патофізіологічні механізми змін у лімфоцитах крові за умов розвитку неопластичних змін яєчника і доповнюють відомості про регуляцію функціонування клітин.

Практичне значення одержаних результатів

Отримані дані можуть сприяти розробці нових додаткових методів діагностики неопластичних змін яєчника та пошуку засобів корекції системи аргінін-оксид азоту та Ca^{2+} -АТФ-залежної регуляторної системи. Результати дисертаційної роботи можуть бути впроваджені у науковий та навчальний

процес з курсу біохімії та лабораторної діагностики для студентів медичних спеціальностей вищих медичних навчальних закладів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, що сформульовані в дисертації

Дисертаційна робота виконана на сучасному методичному рівні з використанням адекватних методів дослідження, що доповнюють один одного. Усі результати проведених досліджень статистично опрацьовані і результати цього аналізу наведені в тексті та таблицях. Наукові положення та висновки обґрунтовані, достовірні, впливають із поставлених завдань і отриманих результатів досліджень та не викликають сумніву. В меті і завданнях дисертаційної роботи повністю розкрито проблема дослідження.

Усі експерименти проводили дотримуючись рекомендацій Комісії з питань біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Особистий внесок здобувача

Дисертантом особисто виконані патентні дослідження та аналіз науково-медичної інформації за темою дисертаційної роботи. Самостійно проведено виконання лабораторних досліджень, статистичну обробку даних. Дисертант, разом зі співавторами, проводив оцінку та узагальнення отриманих даних, написання та підготовку праць до друку. Планування досліджень, аналіз даних, їх інтерпретація та зіставлення з літературними даними, формулювання висновків здійснено за участю наукових керівників. Дисертантом особисто розроблено дизайн рукопису дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації

Дисертаційну роботу апробовано на фаховому семінарі кафедр біохімії, медичної біології та біофізики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 13 від 24 лютого 2021 р.). Результати досліджень та основні положення дисертації були представлені на наукових семінарах кафедри медичної біології (Львів, 2018-2021), X Науково-

практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2017), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми довкілля та здоров'я людини в умовах екологічних і соціальних змін у Європі та в Україні» (Тернопіль, 2018), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019), Підсумковій LXII науково-практичній конференції присвяченій 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2019), XIII Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (Ужгород, 2020), XVIII Конгресі СФУЛТ (Львів, 2020).

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

За темою дисертації опубліковано 11 робіт, з яких 3 статті – у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України (одна з них включена до міжнародної наукометричної бази «Web of Science»), 3 – у інших виданнях і 5 робіт у матеріалах наукових міжнародних і вітчизняних з'їздів, конгресів, конференцій. Наукова новизна, висновки та рекомендації, що наведені в дисертації, достатньо повно відображені в опублікованих працях.

Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення, матеріали для наукової дискусії.

Щодо зауважень.

- В дисертаційній роботі зустрічаються непоодинокі стилістичні та орфографічні помилки.
- Тільки в окремих експериментах наведені дані щодо контрольних груп жінок молодшого та старшого віку, а не у всіх.
- На мій погляд в роботі недостатньо з'ясована роль мієлопероксидази в розвитку рака яєчника.

Однак, тут треба відмітити, що наукова новизна, практична значимість роботи, сформульовані висновки не підлягають сумніву.

Також, хотілось би почути думку дисертанта щодо таких запитань:

1. Які фактори спричиняють активацію iNOS за умов канцерогенезу ?
2. Які чинники стимулюють зростання в плазмі крові глікопротеїну CA-125 при раку яєчника ?
3. Про що свідчить одночасне зростання активностей аргінази та iNOS в лімфоцитах за умов канцерогенезу ?
4. Як пояснити те, що, наприклад, глутатіонпероксидаза чи глутатіонредуктаза, які не є Ca^{2+} -залежними ензимами, у Ваших дослідження *in vitro* проявляють Ca^{2+} -залежність.

ВИСНОВОК

щодо відповідності дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Бариляка Романа Володимировича на тему «Особливості функціонування Ca^{2+} -залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника» є кваліфікаційною науковою працею, в якій містяться нові, науково обґрунтовані результати проведених наукових досліджень щодо особливостей функціонування аргіназо-NO-синтазної, Ca^{2+} -залежної АТФгдролазної та глутатіонової антиоксидантної систем у лімфоцитах периферичної крові жінок хворих на рак яєчника, котрі розв'язують конкретне наукове завдання, що має істотне значення для сучасної біохімії та медицини.

За своєю актуальністю, новизною, теоретичним і практичним значенням, ступенем обґрунтованості та достовірністю положень, висновків і рекомендацій дисертаційна робота Бариляка Романа Володимировича на тему «Особливості функціонування Ca^{2+} -залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок

хворих на рак яєчника» відповідає вимогам «Порядку проведення експеримент) з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06 березня 2019 року № 167, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 Медицина, галузь знань 22 Охорона здоров'я.

Офіційний опонент –

Заступник директора з наукової роботи,
завідувачка лабораторією прикладних біотехнологій
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної
медицини НАМН України»,
доктор медичних наук, ст.в.співр.



С.М. Новікова

