

ВІДГУК

офіційного опонента

доктора біологічних наук, професора кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Навчально-наукового інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Цимбалюк Ольги Володимирівни

на дисертаційну роботу Ван Наня

на тему «Вплив C₆₀ фулеренів на динаміку скорочення musculus soleus щурів після хронічної алкоголізації», поданої до офіційного захисту в разову спеціалізовану вчену раду при Волинському національному університеті імені Лесі Українки на здобуття наукового ступеня доктора філософії із галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дослідження

Довготривале вживання алкоголю призводить до погіршення функціонування скелетних м'язів, причому м'язова дисфункція розвивається незалежно від віку. Найбільш поширеною міопатією скелетних м'язів є хронічна алкогольна міопатія: понад 12% людей страждають на цей стан протягом тривалого часу. Безпосереднім наслідком алкогольної міопатії є погіршення скорочувальної здатності м'язів та зменшення їх сили. Причиною цього є як безпосередня ультраструктурна дезінтеграція міоцитів, їх подальша атрофія, так і зміни електrolітичного гомеостазу та біоелектричної активності. Відомо, що алкогольна міопатія є більш поширеною, ніж інші захворювання (наприклад, цироз, кардіоміопатія або нейропатія), спричинені алкоголізмом. Це може бути пов'язане з розкладанням м'язового білка, спричиненого дією вільних радикалів, які генеруються у великих кількостях у тканинах алкоголізованого організму. Експерименти на щурах засвідчують, що тривалий прийом алкоголю пригнічує синтез білка м'язових волокон II типу, спричиняє дисфункцію нервово-м'язового збудження, зменшує кількість м'язових волокон та силову відповідь. Виникнення м'язової слабкості у разі розвитку алкогольної міопатії певною мірою може бути компенсовано підвищеною активністю синергічних м'язових груп, що призводить до уявного відчуття відсутності значних міотичних ушкоджень. Однак прояв флюктуаційних коливань на фазах утримання максимальних силових зусиль

м'яза призводить до неможливості корекції точного позиціонування суглобів. В результаті цілісний м'яз, як динамічна система, не в змозі адекватно реалізовувати пули нейронної активності, що надходять із центральної нервової системи. Характер і рівень м'язових дисфункцій пов'язані з рівнем розвитку патологічних процесів, аналіз яких у час може бути проведено винятково на феноменологічному рівні.

У процесі розвитку алкогольної міопатії насамперед відбувається утворення вільних радикалів у дисфункційних мітохондріях, що веде до руйнування мембранних структур міоцитів та функціональних порушень їх ензиматичних систем (зниження активності Na^+/K^+ -АТФ-ази та підвищення – Ca^{2+} -АТФ-ази). Пригнічення активності Na^+/K^+ -АТФ-ази порушує процеси збільшення провідності плазмалеми до іонів Na^+ у відповідь на адекватний подразник, таким чином перешкоджаючи розвитку збудження у міоцитах. Це може привести до тимчасового розбалансування часу встановлення гладкого тетанусу, що, в свою чергу, збільшує рівень флуктуаційних коливань силової відповіді м'яза (так званий «тремор»).

Відомо, що C_{60} фулерени здатні ефективно захоплювати та інактивувати вільні радикали у системах *in vitro* та *in vivo*. Більше того, вони проникають у клітини, де накопичуються зокрема в мітохондріях. У ряді експериментів *in vivo* було показано, що введення біосумісних водорозчинних C_{60} фулеренів приводить до значних позитивних терапевтичних ефектів після ініціацій ішемічного пошкодження, втоми, атрофії та травми скелетних м'язів. Однак, зазначені позитивні ефекти істотно залежали від використовуваних доз і схем введення водного розчину C_{60} фулеренів (C_{60}FAS) на тлі ініціації тієї чи іншої патології. Таким чином, дослідження оцінки впливу C_{60}FAS на величину силової відповіді м'язів хронічно алкоголізованих щурів, зокрема, на рівень їх флуктуаційних коливань залежно від дози та схеми застосування (профілактична та терапевтична) препарату є на сьогодні актуальною.

Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами.

Дисертація Ван Наня виконана в межах напряму науково-дослідних робіт кафедри фізіології людини і тварин Волинського національного університету імені Лесі Українки. Робота також була виконана в межах проекту науково-технічної (експериментальної) розробки МОН України «Розробка технології застосування водорозчинних C_{60} фулеренів для зменшення втоми скелетних м'язів» (№ державної реєстрації 0121U109986).

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Обґрунтованість наукових положень, сформульованих у дисертації, забезпечена адекватністю мети та завдань, вибором методичних підходів, а також достатнім обсягом досліджень. Всі результати у роботі отримані та проаналізовані автором самостійно, або за його безпосередньої участі, спільно із науковим керівником. Участь Ван Наня та співробітників у виконанні фрагментів роботи детально представлена в бібліографії опублікованих праць. Здобувачем проведені дослідження на анестезованих тваринах, яким вводили розчин наночастинок C_{60} фулеренів у процесі розвитку алкогольної міопатії скелетних м'язів та визначено рівні змін основних механокінетичних параметрів скорочення muscle soleus щурів (сила скорочення, імпульс м'язової сили, час досягнення максимальної силової відповіді, рівень мінімальної сили скорочення, розвиток процесів втоми - часу досягнення силою 50% і 25% від початкового значення, рівень флуктуацій на фазах утримання максимальних силових рівнів) після хронічної алкоголізації протягом 3, 6 та 9 місяців за дії C_{60} ФВР у різних дозах; проаналізовано біохімічні показники плазми крові (маркери м'язової дисфункції та про-антиоксидантного балансу) після хронічної алкоголізації протягом 3, 6 та 9 місяців за дії C_{60} ФВР у різних дозах; досліджено дію C_{60} фулерену на механокінетичні параметри скорочення скелетного м'яза та біохімічні показники у плазмі крові щурів через 1 місяць після припинення алкогольної інтоксикації.

Обрані методи дослідження дозволили вирішити поставлені завдання,

зробити обґрунтовані висновки з отриманих результатів. Достовірність висновків не викликає сумнівів. Результати роботи в достатній мірі представлені рисунками, які дають чітку уяву про особливості досліджуваних процесів. Автором проведено детальне обговорення положень дисертації із використанням відомостей, що є у сучасній літературі. Отже, наукові положення і висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими.

Достовірність і наукова новизна результатів дослідження

Сформульовані Ван Нанем основні наукові положення та висновки обґрунтовані достатньою кількістю експериментальних досліджень, які проведені на щурах та підтверджуються всією сукупністю результатів досліджень, отриманих та обговорених із використанням сучасних вітчизняних та зарубіжних джерел. Отримані дані опрацьовані статистичними методами аналізу. Перелічене вище дозволяє оцінити отримані результати наукового дослідження, основні наукові положення та висновки як обґрунтовані.

Серед найбільш вагомих елементів наукової новизни можна виділити такі: вперше показано, що при розвитку хронічної алкогольної міопатії, застосування водорозчинного C_{60} фулерену в оптимальній дозі 1 мг/кг покращує процеси відновлення механокінетики скорочення після припинення алкоголізації. Схема спільного введення алкоголю та C_{60} фулерену приводить до віддалення часу виникнення процесів втоми при розвитку хронічної алкогольної міопатії, та покращує якість відновлення механокінетики скорочення скелетного м'яза і є ефективною саме при тривалому розвитку алкогольної міопатії.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Робота виконана на високому науковому та методичному рівнях. В результаті проведених досліджень автором встановлено достатню кількість нових фактів, важливих для розвитку сучасних уявлень про процес розвитку алкогольної міопатії та шляхів її корекції. Результати отримані автором можуть в подальшому виступати теоретико-методологічним підґрунтям для

інших наукових робіт в цьому напрямку. Водорозчинні наночастинки C₆₀ фулеренів можуть бути випробувані у клінічних дослідженнях і увійти до складу препаратів, що використовують у медицині для швидкого відновлення після тривалого вживання алкоголю, а також лікування інших видів міопатії.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій

Наукові положення та висновки, сформульовані в дисертації, є достовірними, оскільки базуються на достатньому фактичному матеріалі. Методи дослідження, застосовані автором, статистичний аналіз отриманих даних цілком відповідають меті та завданням дослідження. Це дозволило автору отримати взаємодоповнюючі факти і дати їм комплексну оцінку. Висновки дисертаційної роботи відображають суть виконання поставлених завдань і досягнення основної мети дослідження.

Обсяг проведених досліджень, адекватний вибір матеріалу забезпечили правильну інтерпретацію отриманих результатів. Нові наукові дані є цілком очікуваними, а використані методи дозволяють відтворювати результати досліджень. Наукова робота достатньо повно і якісно проілюстрована.

Огляд результатів та висновків дисертації, аналіз дисертації за розділами

Представлена дисертація є завершеною науковою роботою, яка складається із вступу, 3 розділів (огляду літератури, матеріали та методи дослідження, результатів досліджень та їх обговорення), узагальнення та висновків. Дисертаційну роботу викладено на 102 сторінках тексту. Вона містить 1 таблицю та 15 рисунків.

У **вступі** переконливо обґрунтовується необхідність проведення даного дослідження, чітко визначено його мету і завдання, виділено наукову новизну і практичне значення, надається інформація щодо апробації результатів дисертації та їх опублікування.

В **огляді літератури**, який складається із дев'яти підрозділів, представлено глибокий системний аналіз літературних джерел останніх років

відносно м'язового скорочення, алкогольної міопатії та втоми, C₆₀ фулеренів та їх медико-біологічного використання та пояснюється їх використання як антиоксидантів.

У **другому розділі** наведено детальний опис операційного втручання та моделювання алкогольної міопатії, приготування та характеристика водного колоїдного розчину C₆₀ фулеренів, детально описано тензометричну установку та параметри м'язового скорочення, які на ній отримувалися, описані методи біохімічного аналізу плазми крові та статистичний аналіз даних.

У **третьому розділі** представлені результати скорочення *musculus soleus* щурів на тлі алкогольної міопатії. Проведено аналіз біохімічних показників плазми крові щурів після хронічного введення алкоголю щурам. Описано застосування водного розчину C₆₀ фулерену за різних способів уведення на механокінетичні параметри скорочення *musculus soleus* щурів та представлено аналіз біохімічних показників плазми крові щурів на тлі алкогольної міопатії *musculus soleus*. Описане дослідження розвитку процесів втоми *musculus soleus* щурів за дії C₆₀ фулерену і хронічної алкоголізації та зміни біохімічних показників плазми крові щурів. Описано результати дослідження біомеханічних параметрів м'язового скорочення після відновлення та гістологічний аналіз алкоголізованих м'язів.

В Узагальненні здійснено порівняння отриманих результатів із аналогічними результатами інших дослідників та пояснення отриманих фактів.

Основні положення дисертаційної роботи відображені у п'яти висновках, які чітко витікають із отриманих результатів, дають відповіді на питання, поставлені дисертантом.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях

Основні результати, одержані під час виконання дисертаційної роботи, опубліковані у 8 наукових статтях, з них 2 статті у спеціалізованих фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, та 4 статті у фахових виданнях, які

індексується наукометричною базою Scopus. За матеріалами дисертації опубліковано 3 тез доповідей на міжнародних конференціях.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації у практиці

Отримані результати та висновки можуть бути використані в освітньому процесі для планування подальших наукових досліджень на кафедрі фізіології людини і тварин, кафедри гістології, кафедри анатомії людини Волинського національного університету імені Лесі Українки, а також можуть стати базою для вдосконалення викладання матеріалу здобувачам освіти на вказаних кафедрах медико-біологічного спрямування.

Отримані результати та висновки можуть бути використані для планування подальших фізіологічних і патофізіологічних досліджень щодо вивчення розвитку силової відповіді міопатичних скелетних м'язів на фоні патологічних станів різного генезу, а також розробки комплексної методики з діагностики і терапії ранніх етапів пошкодження скелетних м'язів людини за використання C₆₀ФВР.

Дотримання принципів біоетики при виконання дисертаційного дослідження

Дисертаційне дослідження Ван Наня за спеціальністю 091- Біологія на тему: «Вплив C₆₀ фулеренів на динаміку скорочення musculus soleus щурів після хронічної алкоголізації» виконане з дотриманням основних положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001 р.), ІСН GCP (1996 р.), Конвенцій Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997р.) та про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2013 рр.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації

Водночас, до представленої дисертаційної роботи є низка зауважень/рекомендацій:

1. Розділ 2: опис статистичних методів оцінки достовірності одержаних результатів є неповним.

2. Малюнки у третьому розділі значно перевантажені фактажем, що значно ускладнює сприйняття. Доцільно кожен графік представляти та описувати окремо.

3. У дисертаційній роботі експеримент здійснено лише на моделі хронічної алкогольної міопатії. Проте у реальному житті часто трапляються гострі випадки зловживання алкоголем. Чи будуть здійснені такі дослідження в майбутньому?

4. Доцільно розширити четвертий розділ і здійснити більш ґрунтовне трактування отриманих результатів.

Разом з тим, ці зауваження жодним чином не впливають на обґрунтованість наукових положень та висновків дисертації, вагомість одержаних авторкою результатів, їх достовірність та загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Виходячи із зазначеного, дисертація Ван Наня ««Вплив C_{60} фулеренів на динаміку скорочення *musculus soleus* щурів після хронічної алкоголізації» є завершеним і актуальним дослідженням. При виконанні цієї роботи дисертантом із застосуванням адекватних сучасних методів були одержані нові оригінальні результати, які є важливими як у теоретичному, так і в практичному аспектах фізіології, біохімії та медицини. Дисертаційна робота Ван Наня відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. (із змінами згідно наказу МОН України № 759 від 31.05.2019 р.) «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та Постанові Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 «Порядок присудження ступеня

доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» щодо дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор Ван Нань заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри молекулярної біотехнології
та біоінформатики Навчально-наукового
Інституту високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Ольга ЦИМБАЛЮК