

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Черемісіної Валентини Федорівни «Патогенетичні особливості резорбції та ремоделювання сполучної тканини при запальних захворюваннях пародонта (експериментальне дослідження)», подану на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія – до спеціалізованої вченої ради Д 55.051.05 при Сумському державному університеті МОН України

**1. Актуальність обраної теми дисертації.** Праця В.Ф. Черемісіної присвячена актуальній проблемі патофізіології та медицини загалом – патогенезу запальних захворювань пародонта. Метою роботи стало з'ясування загальних закономірностей та особливостей механізмів резорбції та ремоделювання сполучної тканини при запальних захворюваннях пародонта – пародонтиті, гінгівіті, альвеоліті – в експерименті.

Запальні захворювання тканин пародонта відносяться до найбільш складних проблем. За даними ВООЗ, на них страждають більше 82% населення у всьому світі. Значна розповсюдженість цих захворювань, великий відсоток втрати зубів при них, патогенний вплив інфекції з вогнищ пародонтального запалення на весь організм визначають не тільки медичну, а й соціальну значущість цієї проблеми. Водночас, такі питання патогенезу запальних захворювань пародонта, як механізми резорбції та ремоделювання сполучної тканини пародонта при цьому, досліджені недостатньо. Разом з тим, подальше встановлення цих механізмів має велике значення для з'ясування патогенезу запальних захворювань пародонта та патогенетичного обґрунтування та розробки нових принципів та методів їхньої діагностики, лікування та профілактики. Відомо, що сполучна тканина не тільки створює каркас тканин організму, а й становить собою, за визначенням О.О. Богомольця, цілісну фізіологічну систему організму, яка, зокрема, відіграє важливу роль у резистентності організму до дії патогенних агентів. Вона бере участь у бар'єрних функціях організму, її елементи здійснюють фагоцитоз, володіють антитоксичною функцією, беруть участь в специфічних імунних реакціях, запаленні і загоєнні ран тощо. Відповідно, сполучна тканина відіграє велику роль в патогенезі усіх хвороб.

Таким чином, дисертаційна робота В.Ф. Черемісіної є актуальною та відповідає сучасним потребам медицини, зокрема, патофізіології.

**2. Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана згідно плану наукових досліджень Національного фармацевтичного університету МОЗ України. Вона є самостійним фрагментом науково-дослідної теми «Клітинні та молекулярні механізми розвитку і корекції патологічних станів», яка має номер державної реєстрації (0115U000966).

**3. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Експериментальні дослідження виконані на великій обґрунтованій кількості лабораторних тварин – 250 дорослих білих нелінійних щурах (240 самців та 10 самиць) та 10 кролях породи Шиншила, вирощених у розпліднику віварію ЦНДЛ НФаУ. Експерименти проведені з дотриманням правил біоетики.

Проведено 9 серій експериментів, в тому числі всі необхідні контрольні дослідження на 40 тваринах.

Моделі запальних захворювань тканин пародонту – пародонтиту, гінгівіту та альвеоліту – є сучасними, апробованими та адекватними меті та завданням дослідження; при цьому модель альвеоліту розроблена дисертанткою зі співавторами та захищена патентом України на корисну модель.

В роботі використані сучасні, високоінформативні та чутливі методи дослідження. Визначали показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантної системи (АОС) спектрофотометричними методами, кислотно-лужного стану мікрометодом Аструпа, продукцію інтерлейкінів (IL) 1 $\beta$ , 1-RA, 2, 4, 6, 8, 10, 17, фактору некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), amph-sRANKL (ліганд рецептора активатора ядерного фактора  $\kappa$ B), остеопротегерину (OPG), трансформуючого фактору росту- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), адипонектину, вісфатину, паратиреоїдного гормону (ПТГ), кальцитоніну, естрадіолу імуноферментними методами, а також вміст оксипроліну, агрегацію тромбоцитів, показники білкового обміну, гістологічні та гістохімічні дослідження. Біохімічні, імуноферментні, імунологічні, гематологічні (агрегатометрія) дослідження проведено в атестованих ЦНДЛ НФаУ, ЦНДЛ ХМАПО, гістологічні та гістохімічні дослідження – на кафедрі гістології ХНМУ.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснено сучасними високоінформативними та чутливими методами варіаційної статистики та кореляційного аналізу пакету програм Statistica 8.0.

У роботі використано достатню кількість експериментального матеріалу, що у сукупності з його адекватною статистичною обробкою забезпечило його достовірний аналіз, обґрунтованість наукових положень і висновків, досягнення мети та вирішення завдань дисертаційної роботи.

Все це однозначно свідчить про високий ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

**4. Наукова новизна дослідження та отриманих результатів.** Дослідження та одержані дані характеризуються істотною науковою новизною. Дисертанткою встановлено, що моделювання гострих запальних захворювань тканин пародонту призводить до розвитку порушень механізмів

регуляції сполучної тканини. Основою цього процесу є дисбаланс у системі цитокінів. Найбільш виразні зміни спостерігаються при пародонтиті, найменш – при альвеоліті.

Виявлено, що досліджувані біохімічні маркери кісткового метаболізму (кальцій, фосфор, мідь, цинк) є важливими медіаторами в формуванні кісткової тканини. Вони можуть як запобігати передчасному її руйнуванню, так і сприяти відновленню. Показано, що отримана послідовність зниження оптичної густини кісткової тканини альвеолярного відростку нижньої щелепи у щурів при різних експериментальних моделях відображає значення гормонального фактору у патогенетичних механізмах розвитку порушень метаболізму сполучної тканини пародонту.

Виявлено, що розлад взаємодії клітин сполучної тканини з тромбоцитами визначає порушення механізмів репаративної регенерації і вихід патологічного процесу на системний рівень. Показано, що індуктор агрегації тромбоцитів АДФ в концентрації 10 мкмоль/л є основним молекулярним посередником зриву природного перебігу репаративної регенерації.

Встановлено, що регуляція ремоделювання сполучної тканини знаходиться під керуванням сигнального шляху системи RANKL, рецептора активатора ядерного фактора κB (RANK) та OPG.

Гістологічне та гістохімічне дослідження експериментального матеріалу свідчить про одночасну присутність як в м'яких, так і в твердих тканинах пародонту клітин сполучної тканини, що відповідають за резорбцію та ремоделювання неорганічного та органічного кісткового матриксу.

**5. Важливість отриманих результатів для науки і практики.** Одержані дані мають важливе теоретичне і практичне значення. Автором отримані нові знання про роль сполучної тканини пародонта при його запальних захворюваннях, які розширюють та поглиблюють існуючі уявлення про загальні механізми регулювання стереотипної відповіді на запалення та значення системи сполучної тканини в його реалізації. Особливе значення має встановлення механізмів цієї відповіді – ролі біохімічних маркерів кісткового метаболізму, гормонального фактору, тромбоцитарної ланки гемостазу та міжклітинних медіаторів у формуванні відповіді сполучної тканини на пошкодження на рівні сполучної тканини пародонта.

Результати роботи можуть бути використані у викладанні патофізіології та інших медичних та біологічних наук, у науково-дослідній роботі, а також для розробки способів діагностики, лікування та профілактики запальних захворювань пародонта.

Отримані дані впроваджено в навчальний процес на кафедрах низки медичних та фармацевтичного закладів вищої освіти України, що підтверджено відповідними актами впроваджень.

**6. Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** Авторкою за темою дисертації опубліковані 23 статті, з яких 3 – у виданнях, які входять до наукометричної бази SCOPUS, 1 стаття – у виданні, включеному до наукометричної бази Web of Science, 13 статей – у наукових фахових виданнях України, що реферуються міжнародними наукометричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus International, Google Scholar, 6 статей – у наукових закордонних виданнях медичного напрямку; як вже вказувалося, отриманий патент на спосіб моделювання альвеоліту; опубліковано 16 тез у матеріалах конгресів і конференцій з міжнародною участю.

Аналіз основного змісту опублікованих робіт дозволяє зробити висновок, що всі наукові положення і висновки, наведені в дисертації, відображені в опублікованих працях.

Автореферат дисертації в повній мірі відповідає змісту дисертаційної роботи, написаний чітко, грамотно, досить ілюстрований.

**7. Рекомендації щодо використання результатів та висновків.** Отримані авторкою дані можуть бути використані в науковій та навчальній роботі медичних науково-дослідних установ та закладів вищої освіти, а також як теоретичне підґрунтя для відповідних клінічних досліджень та подальшої розробки способів діагностики, лікування та профілактики запальних захворювань пародонта.

**8. Оцінка змісту дисертації.** Робота викладена на 292 сторінках комп'ютерного тексту, побудована в традиційному стилі і складається з анотацій, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 7 розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та додатків. Список літератури надано наприкінці кожного розділу. Загальна кількість використаних джерел літератури становить 452 найменування (284 кирилицею, 168 латиницею). Дисертаційна робота ілюстрована 39 таблицями, 49 рисунками.

У **вступі** авторка обґрунтовує актуальність обраної теми дисертації, розкриває її зв'язок з плановою науковою темою, формулює мету та задачу дослідження, наукову новизну та практичне значення роботи, вказує особистий внесок у дослідження, наводить дані про апробацію результатів та кількість публікацій за темою дисертаційної роботи. Дисертантка досить повно відобразила сутність і стан наукової проблеми та її значущість, підстави та вихідні дані для розробки теми, обґрунтувала необхідність проведення дослідження за темою дисертаційної роботи.

**Огляд літератури** докладний і структурований, авторкою наведені сучасні дані про анатомо-фізіологічні особливості системи сполучної

тканини, резорбцію та ремоделювання, етіологію, патогенез та лікування запальних захворювань пародонта. Визначені невивчені на сьогоднішній день або неоднозначні аспекти досліджуваної проблеми. Огляд літератури підтверджує актуальність подальших досліджень питань етіології та патогенезу захворювань пародонту, нові знання про які дозволять підвищити ефективність лікування і профілактики цієї патології.

У **розділі 2** «Матеріали та методи дослідження» авторкою наведена постановка дослідження, опис використаних експериментальних моделей, біохімічних, імуноферментних, імунологічних, гематологічних (агрегатометрія), гістологічних, гістохімічних та статистичних методів дослідження, більш детальний перелік та оцінка яких опонентом надані вище – у пункті 3 цього відгуку.

**Розділи 3-9** присвячені опису результатів власних досліджень авторки і, у свою чергу, є структурованими.

При викладенні результатів власних досліджень дисертантка детально описує отримані нею дані.

У **розділі 3** авторка висвітлює результати дослідження реакції сполучної тканини різних органів на гостре локальне запалення шкіри спини щурів та імуноморфологічні та імуногістохімічні особливості сполучної тканини пародонта при гінгівіті та пародонтиті. Дисертанткою встановлено, що у відповідь на місцеве пошкодження виникають фазові зміни сполучної тканини щурів, які носять як локальний, так і генералізований характер. Етапність процесів, що відбуваються у віддалених від вогнища запалення органах, відповідають класичній схемі розвитку запальної реакції: на ранніх строках – переважання ексудативних явищ, які на більш пізніх строках (дві доби) змінюються проліферацією. Поряд з відповіддю з боку клітин імунної системи – лейкоцитів, макрофагів, тучних клітин, спостерігаються генералізовані зміни з боку клітин фібробластичного ряду – підвищення їх кількості, підвищення продукції колагену, зміни проліферативного потенціалу. Сполучна тканина пародонта активно реагує на скипидарне запалення шкіри спини щурів аналогічно сполучній тканині в інших органах. Характерною гістологічною і імуногістохімічною ознакою при гінгівіті є пріоритетна участь у запаленні Т-лімфоцитів, сегментоядерних нейтрофілів та Т-лімфоцитарний периваскуліт. При пародонтиті характерною морфологічною ознакою є пошкодження слинних залоз та перигранулярні інфільтрати.

**Розділ 4** присвячений ролі мікроелементів та гормонів у механізмах резорбції та ремоделювання сполучної тканини при запальних захворюваннях пародонта, зокрема, значенню порушень кальцій-фосфорного обміну, особливостям обміну міді та цинку при гінгівіті та пародонтиті, а також ролі ПТГ, кальцитоніну та естрадіолу. Одержані результати свідчать про те, що протягом 2-х тижнів захворювання в процесі резорбції тканин пародонта включаються процеси ремоделювання, найбільш виражені у щурів

з пародонтитом. Виявлені значні зсуви кальцій-фосфорного обміну у щурів з альвеолітом та його участь у резорбції сполучної тканини пародонта. Зміни рівнів ПТГ, кальцитоніну та естрадіолу в крові щурів із запальними захворюваннями тканин пародонта свідчать про значення гормонального фактору в патогенетичних механізмах розвитку порушень метаболізму сполучної тканини пародонта. Однак, вміст кальцитоніну та естрадіолу не має вирішального значення в механізмах резорбції м'яких тканин пародонта. Відновлення вмісту ПТГ в крові щурів може свідчити про нормалізацію обміну сполучної тканини при хворобах пародонта. Встановлений негативний кореляційний взаємозв'язок між рівнем іонізованого кальцію і рівнем кальцитоніну в крові щурів з альвеолітом. Гіпокупремія та гіпоцинкемія практично не обтяжують процеси резорбції сполучної тканини у щурів з пародонтитом. Гіпокупремія у щурів з гінгівітом може гальмувати проліферацію клітин сполучної тканини та прискорювати процес дозрівання протеогліканів. Іони міді є необхідним матеріалом, як в процесі резорбції, так і в процесі ремоделювання при захворюваннях пародонта. Одним із головних симптомів розвитку захворювань тканин пародонта є морфологічне зниження відносної площі трабекул та розширення міжтрабекулярного простору.

**Розділ 5** присвячений вивченню кислотно-основного стану (КОС) крові та змішаної слини порожнини рота щурів із запальними захворюваннями пародонта. Встановлено, що основним діагностичним показником порушення КОС крові та слини щурів при захворюваннях пародонта є рН та надлишок чи дефіцит основ (ВЕ). При цукровому навантаженні відбувається накопичення кислих еквівалентів, зниження рН змішаної слини, концентрації неорганічного фосфату та підвищення вмісту кальцію. Найбільш виражені зміни спостерігаються у щурів з пародонтитом, найменш – у щурів з альвеолітом. При карбамідному навантаженні фосфатна буферна система слини підключається переважно для корекції КОС при значеннях рН нижче 6,0. Зменшення активності секреції фосфату слинними залозами обумовлене розвитком алкалозу в ротовій порожнині щурів. У тварин з гінгівітом та альвеолітом характер часової залежності концентрації неорганічного фосфату не відрізнявся від контролю, а у щурів з пародонтитом виявлений випереджувальний характер стабілізації концентрації неорганічного фосфату в порівнянні із стабілізацією рН. Визначення рН ротової рідини може бути показником у діагностиці порушень тканинного метаболізму та контролі ефективності фармакотерапії запальних захворювань пародонта.

У **розділі 6** наведені дані про зміни функціональної активності тромбоцитарної ланки гемостазу при експериментальному моделюванні порушень сполучної тканини пародонта. Встановлено, що у щурів з експериментальним пародонтитом відбувається зниження агрегаційної активності тромбоцитів. Порушення стану сполучної тканини пародонта проявляються перебудовою судинного басейну, порушенням мікроциркуляції крові, зривом регуляторних механізмів репарації, виходом

патологічного процесу на системний рівень. При експериментальному пародонтиті виявлені чіткі зміни функціональної активності тромбоцитів: при всіх концентраціях індуктора агрегації (АДФ в дозі 2,5 мкмоль/л, 5,0 та 10,0 мкмоль/л) знижується ступінь та швидкість агрегації, а також час досягнення максимальної швидкості агрегації. При гінгівіті змінюються агрегаційні властивості тромбоцитів і, в поєднанні з порушенням мікроциркуляції, починається процес ремоделювання тканин пародонту. Низькі концентрації (2,5 мкмоль/л) АДФ підвищують функціональну активність тромбоцитів, що характеризує ступінь та швидкість агрегації у щурів з альвеолітом, і не змінюють ці показники у тварин з гінгівітом. Високі концентрації (5,0 та 10,0 мкмоль/л) АДФ не впливають на функціональну активність тромбоцитів у тварин з альвеолітом; у щурів з гінгівітом призводять до зниження швидкості агрегації та часу максимальної швидкості та ступені агрегації. У щурів з гінгівітом рівень прозапального ІЛ-6 зменшується, а протизапального ІЛ-4 – підвищується.

**Розділ 7** стосується обмінних процесів сполучної тканини організму та їх ролі в резорбції та ремоделюванні в тканинах пародонта, зокрема, рівня оксипроліну в крові у тварин з пародонтитом, гінгівітом та альвеолітом, стану тканин пародонта, пов'язаному з порушеннями кисневого режиму, ролі еритроцитів та циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в патогенезі запальних захворювань пародонта, енергетичному метаболізмі мітохондрій при захворюваннях пародонта. Виявлено, що при низькій інтенсивності запального процесу в пародонті (альвеоліт) синтез та деградація колагену знаходиться у відносній рівновазі, а підвищення його інтенсивності (гінгівіт, і, особливо, пародонтит) призводить до порушення цієї рівноваги. Концентрація вільного та пептидзв'язаного оксипроліну в крові вища в щурів з більш тяжким протіканням запального процесу в пародонті (пародонтит та гінгівіт). При пародонтиті у кролів відбувається активація ПОЛ і зниження активності антиоксидантних ферментних систем. Виявлено односпрямованість змін ПОЛ і антиоксидантних ферментних систем як в сироватці крові, так і в гомогенаті тканин нижньої щелепи пародонта. Зсуви, що відбуваються в системі ТБК-реактивних, каталази і церулоплазміну, підтверджують, що в механізмі розвитку захворювань пародонта мають місце кисневозалежні механізми. Концентрація CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитів навколо кровоносних судин при гінгівіті та навколо дрібних слинних залоз при пародонтиті з лімфоепітеліальними та лімфоендотеліальними пошкодженнями свідчить про автоімунну цитотоксичну агресію в патогенезі досліджуваних захворювань. Виявлені виражені порушення з боку еритроцитів та ЦІК. Відбувалося збільшення загального рівня ЦІК, в основному, за рахунок найбільш токсигенних дрібно- та середньомолекулярних їх фракцій. Показано, що при гінгівіті розвивається окиснювальний стрес та посилення генерації АФК. Зміни кількості еритроцитів, гемоглобіну і еритроцитарних індексів при гінгівіті обумовлені

мембранодеструктивними процесами в еритроцитах, зменшенням їх абсолютного числа внаслідок гемолізу, а також змінами гематокриту за рахунок перерозподілу крові. Встановлено, що захворювання сполучної тканини пародонту є енергозалежними процесами, що проявляється у вигляді зниження концентрації АТФ на тлі підвищення рівнів АДФ та АМФ порівняно з контролем. Мітохондрії енергетично забезпечують процеси резорбції та ремоделювання тканин пародонта.

**У розділі 8** розглядаються роль адипокінів (адипонектин, вісфатин) у механізмах регуляції процесів ремоделювання сполучної тканини пародонта при пародонтиті та альвеоліті та механізми дії OPG, RANKL та IL-17 в резорбції та ремоделюванні тканин пародонта. Показано, що при порушенні кісткового метаболізму у щурів з пародонтитом підвищуються рівні обох досліджуваних адипокінів. Динаміка вмісту адипонектину та вісфатину при пародонтиті свідчить про значну участь адипокінів в процесах ремоделювання сполучної тканини. Зникнення взаємозв'язків в системі нормальної регуляції ремоделювання сполучної тканини між одними парами цитокінів та поява їх між іншими парами свідчить про порушення в роботі регуляторних механізмів сполучної тканини при пародонтиті. Характер зміни рівнів IL-1RA і OPG має зворотну спрямованість процесів, що дозволяє припустити існування механізму зворотного негативного зв'язку між порушеннями кісткового метаболізму й запальним процесом в пародонті, що реалізується у вигляді вивільнення міжклітинних медіаторів. При пародонтиті підвищуються рівні RANKL та прозапального IL-17, а вміст OPG знижується. Виявлені кореляційні зв'язки між рівнем IL-17, RANKL та OPG свідчать про важливу роль досліджуваних цитокінів в механізмах резорбції та ремоделювання при пародонтиті.

**У розділі 9** наводяться результати морфологічного вивчення експериментального матеріалу, отриманого від щурів та кролів із запальними захворюваннями пародонта. Проведене гістологічне та гістохімічне дослідження у тварин з пародонтитом, гінгівітом та альвеолітом показало, що у м'яких та кісткових запальних тканинах пародонта постійно відбуваються процеси як резорбції, так і ремоделювання за активної участі остеобластів, остеобластів, фібробластів та інших клітин сполучної тканини.

**У розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження»** дисертантка узагальнює усі отримані результати, порівнюючи свої дані з літературними. Розділ свідчить про її вміння аналізувати та обґрунтовувати результати наукових досліджень.

**Висновки** логічні, стислі, відображають отримані результати, відповідають меті та завданням дослідження та свідчать про завершеність роботи.

**9. Недоліки дисертації й автореферату щодо їх змісту й оформлення.** Принципових зауважень до змісту та оформлення дисертації та автореферату



немає. Побажання – добре було б, якби робота завершувалася підсумковою схемою за даними літератури та власних досліджень, на якій було б показане місце досліджуваних механізмів у патогенезі запальних захворювань пародонта.

У рамках наукової дискусії хотілося б отримати відповіді дисертанта на такі запитання:

1. У Вашій дисертації великий розділ присвячений вивченню функціональної активності тромбоцитів. Чим обґрунтовується доцільність даних досліджень в контексті теми Вашої дисертації?

2. Те ж саме запитання стосується розділу, присвяченого дослідженню кислотно-основного стану крові та змішаної слини порожнини рота щурів із запальними захворюваннями пародонта.

3. Чи не могли б Ви конкретизувати роль регуляторного шляху RANK-RANKL-OPG та, зокрема, остеопротегерину в механізмах резорбції та ремоделювання сполучної тканини пародонту?

4. Яку роль адипокіни, зокрема, адипонектин та вісфатин, відіграють у процесах резорбції та ремоделювання?

Ці запитання є суто дискусійними і не зменшують позитивну оцінку дисертації та наукову і практичну цінність роботи.

#### **10. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Дисертація Черемісіної Валентини Федорівни «Патогенетичні особливості резорбції та ремоделювання сполучної тканини при запальних захворюваннях пародонта (експериментальне дослідження)» є завершеною кваліфікаційною науково-дослідною працею, яка містить наукові положення та науково обґрунтовані результати проведених безпосередньо авторкою досліджень у медичній галузі науки, зокрема, в патофізіології, що розв'язують важливу наукову проблему, а саме: з'ясування загальних закономірностей та особливостей механізмів резорбції та ремоделювання сполучної тканини при запальних захворюваннях пародонта.

Таким чином, дисертація відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів» стосовно дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук (Постанова Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, зі змінами), а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

#### **Офіційний опонент:**

доктор медичних наук, професор,

проректор з науково-педагогічної роботи та питань розвитку,

професор курсу патофізіології

Чорноморського національного університету

імені Петра Могили МОН України

Клименко

Підпис Клименко М.О. засвідчую  
Начальник ВК О.А. Саєнко

