

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Лупак Мар'яни Ігорівни

“Молекулярні механізми антидіабетичної дії екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.)”, поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

1. Актуальність вибраної теми

Лікування цукрового діабету є актуальною та водночас надзвичайно складною проблемою сьогодення, вирішення якої потребує комплексних підходів з метою запобігання розвитку метаболічних, структурних та функціональних порушень в організмі. Вагомий науковий інтерес у цьому плані становлять фітопрепарати, які містять комплекси біологічно активних сполук. Вони впливають одночасно на кілька систем організму, що й забезпечує позитивний клінічний ефект. Беззаперечно, дана дисертаційна робота, яка спрямована на пошук принципово нових за механізмом дії антидіабетичних препаратів природного походження, актуальна як у науковому, так і в практичному аспектах.

2. Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих в дисертації

Дисертаційна робота базується на результатах аналізу значного обсягу фактичного матеріалу, отриманого з використанням сучасних біохімічних, молекулярно-біологічних, цитологічних, імуноцитохімічних та гістологічних методів. Тому результати досліджень, представлені в дисертації М. Лупак, їх аналіз, основні положення і висновки достатньо обґрунтовані, а виявлені ефекти статистично достовірні.

3. Новизна основних наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації

В дисертаційній роботі М. Лупак було проведене комплексне дослідження біохімічних ефектів дії екстракту галеги лікарської (E^{ps}) на структурно-функціональний стан лейкоцитів та β -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози щурів у нормі та за умови експериментального цукрового діабету (ЕЦД). Ґрунтуючись на біологічних ефектах цього екстракту експериментально підтверджена його ефективна антидіабетична дія. Зокрема, вперше показано, що введення E^{ps} призводить до підвищення концентрації інсуліну та С-пептиду у плазмі крові та виявляє цитопротекторний вплив на підшлункову залозу щурів за ЕЦД. Доведено, що E^{ps} зменшує прояви оксидативно-нітрозитивного стресу. Продемонстровано пригнічуючий вплив E^{ps} на апоптоз лейкоцитів, інтенсивність якого значно підвищується за умов діабету. Виявлена стимуляція проліферації та диференціації клітин попередників лейкоцитів на фоні зростання вмісту фактору некрозу пухлин - α (ФНП- α) за досліджуваної патології. Встановлено, що введення E^{ps} хворим на діабет тваринам виявляє коригуючий вплив на полімеризацію актину в лейкоцитах.

4. Науково-практична цінність роботи і конкретні шляхи застосування результатів досліджень

Результати досліджень мають як фундаментальне, так і прикладне значення. Вони розширюють і поглиблюють наукові відомості про молекулярні механізми антидіабетичної дії галеги лікарської. Вважаю, що робота значно би виграла, якби на основі встановлених в ній закономірностей автором було розроблено практичні рекомендації щодо введення безалкалоїдної фракції галеги лікарської до складу харчових добавок для людей і тварин, які в групі ризику ЦД I типу. Також дисертантом вперше проведена стабілізація безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської додаванням біоПАР, які синтезуються бактеріями *Pseudomonas sp.* PS-17, що варто було б запатентувати.

5. Повнота викладу основних наукових положень та висновків у опублікованих наукових працях

Результати досліджень знайшли відображення в 12 наукових працях, з яких 6 статей та 6 тез доповідей на конференціях різних рівнів. Опубліковані роботи повністю висвітлюють отримані результати, положення і висновки дисертації. Приємно зазначити, що одна зі статей опублікована у англійськомовному журналі, але я вважаю, що більшу частину отриманих результатів варто було надрукувати у міжнародних виданнях.

6. Структура дисертації

Робота побудована за традиційною схемою і складається з таких розділів, як «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень», «Аналіз і узагальнення результатів досліджень», «Висновки» та «Список використаних джерел». Однак обсяг розділу «Матеріали і методи досліджень» та «Результати досліджень» співвідносяться практично як 1:1, а мав би бути зсув на користь результатів досліджень за рахунок їх обговорення.

Хочу звернути увагу на перелік умовних скорочень. Як на мене, то він недосконалий. До нього можна додати ще декілька скорочень, які часто зустрічаються в тексті і не використовуються широким загалом, на відміну від ІЛ та ІФН, які введені у цей перелік. Я маю на увазі ПМЯЛ, ЗФР, Fas, PTEN, WASP, які по тексту дисертації або не розшифровані (ПМЯЛ, ЗФР, Fas), або розшифрування наведене лишень англійською мовою (PTEN, WASP).

Розділ «Вступ» написаний логічно і висвітлює всі необхідні моменти.

«Огляд літератури» займає 28 сторінок і висвітлює сучасний стан проблеми, яку вирішувала дисертантка. Викладений матеріал ще раз доводить актуальність теми роботи, а наведена інформація в сукупності достатня для обговорення експериментальних даних. Проте, незважаючи на добре висвітлений в огляді літератури матеріал, до цього розділу у мене, як опонента, є певна кількість запитань та зауважень технічного характеру:

(1) У пункті 1.1. (ст. 13) йдеться про механізми виникнення оксидативно-нітрозитивного стресу за умов цукрового діабету I типу. Однак, описані механізми є дещо загальними. Зокрема, не зрозуміло чи є різниця в індукції оксидативного стресу в чутливих і нечутливих до інсуліну клітинах?

(2) У підпункті 1.1.1 (ст. 16) акцент обговорення проблеми зсувається на лейкоцити. Саме ці клітини використані в експериментальній частині роботи як такі, в яких індукується оксидативно-нітрозитивний стрес за умов експериментального цукрового діабету. Але хотілось би почути обґрунтування чому саме лейкоцитам відведена роль експериментальних мішеней в роботі, а не, скажімо, клітинам ендотелію чи бета-клітинам острівців Лангерганса? Адже відомо, що поліморфноядерні лейкоцити самі генерують досить багато активних форм кисню.

(3) Опис вільнорадикальних перетворень в організмі ссавців (ст. 17) досить «сухий», оскільки не підкріплений рівняннями реакцій та посиланнями на джерела літератури.

(4) У підпункті 1.2.1 (ст. 21-22), де йде мова про апоптоз у регуляції імунних механізмів, пошукач наводить дані про роботу системи Fas-FasL. Проте автор роботи не розшифровує, що Fas-FasL – це система рецептор-ліганд. І лише у наступному підпункті 1.2.2 стає зрозуміло як працює дана система. Можливо, варто було змінити порядок подачі матеріалу.

(5) В огляді літератури і далі в роботі зустрічаються деякі технічні огріхи.

(6) Огляд літератури бажано було б закінчити логічним підведенням до роботи і формулюванням мети і завдань.

Розділ «Матеріали і методи досліджень» є дуже об'ємним і включає 27 пунктів, не враховуючи підпункти. Цей розділ містить досить широкий спектр використаних експериментальних підходів і свідчить про системний підхід дисертанта та його керівника до роботи. Не можу не звернути увагу на масштабність роботи, оскільки дисертантом використано не лише ряд сучасних методів, але і 380 піддослідних тварин. На загал цей розділ добротний і слугує серйозною основою для довіри до отриманих результатів.

Однак цей розділ теж не позбавлений певних недоліків:

(1) Пункт 2.2 (ст.43) Пункт «Характеристика об'єкту досліджень» дещо невдала і не містить жодної характеристики заявлених «об'єктів».

(2) Пункт 2.3 (ст.43) «Отримання безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської» описано детально, але не зовсім зрозуміло. При бажанні цю методику складно відтворити. Зокрема, автор пише: «до максимально упареного етанольного екстракту масою 14 г додавали 9 мл H₂O (до отримання однорідної маси) та 9 мл хлороформу» Не зрозуміло чи це одночасно чи це два окремі випадки? Далі описано, що отримували дві фракції: водну та хлороформну. Мені не зрозуміло для чого дисертант отримувала водну фракцію, якщо вона є алкалоїдвмісною, а в експериментах йдеться про безалкалоїдну хлороформну? Також у цьому пункті і далі по тексту всюди вказується абсолютні значення кількості речовин, які

змішували. Вважаю, що краще вказувати співвідношення при розведенні та кінцеві концентрації компонентів у сумішах.

(4) У деяких протоколах відсутні формули для обрахунків показника, що визначався (вміст карбонільних груп білків, активності NO-синтази, вмісту нітрит- та нітраг-аніонів). Правда, це не завжди необхідно.

(5) Є ряд невдалих виразів чи навіть неточностей: «загальні алкалоїдні реактиви» (ст. 45), «хроматографічна колонка довжиною 30 м????» (ст. 46), «епендорфівські пробірки» (ст. 59), тощо.

Результати власних досліджень викладені у семи підрозділах. Тут помітна чітка логіка викладу. Кожен підрозділ присвячений певному блоку проблем, вирішення яких проілюстровано відповідними висновками. Дисертантом проаналізована колосальну кількість показників, що вказує на глибину і системність роботи. Проведене комплексне дослідження біохімічних ефектів дії екстракту галєги лікарської (E^{ps}) на структурно-функціональний стан лейкоцитів та β -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, вміст інсуліну та С-пептиду у плазмі крові, прояви оксидативно-нітрозитивного стресу в лейкоцитах, проліферацію та диференціацію клітин попередників лейкоцитів, полімеризацію актину та процеси апоптозу у лейкоцитах.

До незначних недоліків розділу можна віднести наступні:

(1) У більшості таблиць (3.2; 3.3; 3.4; 3.5 і т.д.) середня арифметична величина і помилка середньої подані з різною точністю. Значущі цифри у середньому та його похибці іноді зустрічаються різні. Те ж саме стосується і автореферату. Наведу приклад: на ст. 83 у таблиці наведені результати морфометричного дослідження підшлункової залози. Діаметр острівців у мікрометрах представлений як $161,9 \pm 5,548$. Хіба така висока чутливість морфометричного методу? Ці дані краще навести як 162 ± 5 .

(2) На рис. 3.4. (ст. 78) наведена примітка про умовні скорочення вірогідної різниці між значеннями. Далі примітка відсутня на всіх інших рисунках і таблицях. Це ускладнює роботу з матеріалом, адже ілюстрації мають бути самодостатніми і нормально сприйматися окремо від тексту.

На ст. 78 дисертант констатує факт, що «у разі введення E^{ps} контрольним тваринам відмічено зсув піку концентрації глюкози з 20-ї на 80-у хвилину проведення ГТТ, і підвищення значень цього показника у 1,4 рази щодо початкового рівня». Як ви можете пояснити даний ефект?

Розділ «Аналіз і узагальнення результатів досліджень» написаний послідовно, а його зміст вдало підсумовує та узагальнює основні результати, отримані в роботі.

«Висновки», здебільшого, зроблені коректно і повністю відповідають отриманому матеріалові. Лишень у висновок №5 я б додав інформацію стосовно екстерналізації фосфатилсерину, оскільки базувати висновок про пригнічуючий вплив препаратів галєги на апоптоз клітин тільки на даних по співвідношенню білків-регуляторів апоптозу – p53 й Bcl-2 не зовсім коректно і неоднозначно.

Всі зроблені зауваження не мають принципового характеру і тому не применшують вагу проведених досліджень і не псують загальне позитивне враження про роботу.

7. Висновок

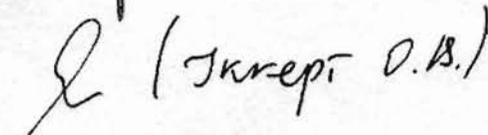
Аналіз поданих для розгляду матеріалів (рукописи автореферату і публікацій), основних положень і висновків дисертації, з врахуванням новизни, практичного значення і статистичної надійності отриманої інформації дозволяє дійти висновку, що дисертаційна робота Мар'яни Лупак «Молекулярні механізми антидіабетичної дії екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.)» є закінченим науковим дослідженням. Робота відповідає вимогам, які пред'являються до дисертацій на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «Біохімія», а її автор заслуговує присудження вказаного наукового ступеня.

Офіційний опонент
доктор біологічних наук, професор,
завідувач кафедри біохімії та біотехнології
Прикарпатського національного університету
імені Василя Стефаника



Володимир Лушчак



Ві друк
картичків у спеціалізовану
всезу раду 18.01.2016 р.
секретар СВР К 35.05.1.14
 (Жукерт О.В.)