

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Прищепи Ірини Володимирівни

«Стан проміжних філаментів астроглії, показники апоптозу та окисного стресу в тканині головного мозку і сітківці щурів за умов стрептозотоцин-індукованої гіперглікемії і дії фулерену C₆₀», що подана до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

1. Актуальність обраного напрямку досліджень.

Цукровий діабет (ЦД) є багатофакторним метаболічним захворюванням, поширеність якого з кожним роком зростає і швидко «молодіє». Це захворювання супроводжується численними ускладненнями та становить на даний час одну з найважливіших медико-соціальних проблем, яка потребує науково обгрунтованого вирішення. Відомо, що тривала гіперглікемія, що виникає внаслідок дефіциту інсуліну, призводить до неферментативної глікації протеїнів, уповільнення оновлення та порушенню їх функцій, що клінічно проявляється мікро- та макроангіопатіями, ретино- та нейропатіями тощо. Це істотно знижує якість життя хворих і часто призводить до зниження працездатності та втрат чисельності населення. Серед ускладнень, що є основною причиною інвалідизації та летальності серед хворих на цукровий діабет, чільне місце посідають ушкодження нервової системи та зору. Незважаючи на велику кількість досліджень, біохімічні механізми розвитку нейропатій за тривалої гіперглікемії остаточно не з'ясовані.

На сьогодні відомо, що цукровий діабет пов'язаний з розвитком окисного стресу, а нервова система є найбільш чутливою до цього стану. Експериментально доведено, що збільшений окисний стрес є основною причиною патогенезу сітківки у хворих на гіперглікемію. Сітківка ока людини споживає кисень на 300–600% більше, ніж кора головного мозку та серцевий м'яз, відповідно, тому сітківка та її судинна мережа є більш схильними до

окисного стресу. Саме сітківка ока та відділи головного мозку були основними об'єктами досліджень в роботі І.В. Прищепи.

Актуальність обраного дисертантом напрямку досліджень підсилюється ще тим, що одночасно біохімічно обґрунтовуються нейропротекторні властивості фулерену, який створений за сучасними нанотехнологічними методами і для якого доведено потужні антиоксидантні властивості. На сьогодні фулерен вважають перспективним лікувальним засобом нового покоління.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана на базі кафедри біофізики та біохімії «Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара» в межах держбюджетних науково-дослідних робіт “Використання природних антиоксидантів та продуктів нанотехнологій в якості нейропротекторів за умов несприятливого впливу навколишнього середовища та метаболічних порушень” (номер державної реєстрації 0113U003041). та “Молекулярно-біохімічні механізми когнітивного дефіциту мозку та ретинопатії за умов антропогенного навантаження та порушення системи травлення” (номер державної реєстрації 0116U001521).

3. Ступінь обґрунтованості основних положень і висновків, зроблених у дисертації.

Основні положення та висновки, що зроблені Прищепою І.В., базуються на достатньої кількості експериментальних досліджень, ретельному аналізі отриманих результатів та їх обговоренні із залученням вітчизняних та закордонних літературних джерел, що дозволяє оцінити одержані в роботі результати, положення та висновки, як науково обґрунтовані.

4. Достовірність основних положень, висновків, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.

Основні наукові положення, що виносяться на захист Прищепою І.В., ґрунтуються на результатах досліджень, що проведені за допомогою сучасних методів клінічної біохімії (визначення рівня глюкози, глікозильованого гемоглобіну, інсуліну, продуктів ПОЛ, вмісту білка), імунохімічного аналізу з використанням високоспецифічних антитіл до досліджуваних протеїнів (ГФКБ, каспаза-3, ПАРП), гістологічного та імуногістохімічного аналізу.

Результати досліджень оброблені з використанням параметричних та непараметричних статистичних критеріїв для малих виборок, застосуванням Т-Критерію Ст'юдента, критерію χ^2 -розподілення), перевіркою гіпотез про рівність генеральних дисперсій (F-критерій Фішера та G-критерій Кохрена) та про грубі похибки (критерій Шовене). У випадках відхилення варіювання елементів вибірки від нормального були використані непараметричні критерії (U-критерій Уїлкоксона-Манна-Уїтні). Всі розрахунки проведено за допомогою програм "Statistica 6.0" та "Excel 2000". Все зазначене вище свідчить про достовірність отриманих результатів та відповідність зроблених висновків.

5. Новизна основних наукових положень, висновків та одержаних результатів.

У дисертаційній роботі І.В. Прищепи здійснено системний аналіз астрогліальної реактивації за умов експериментальної стрептозотоцин-індукованої гіперглікемії і перевірена робоча гіпотеза про застосування наночасток фулерену C_{60} з метою попередження надмірного астрогліозу і гіперглікемічних ускладнень в тканині мозку та сітківки. В результаті проведених досліджень дисертантом було отримано нові дані стосовно впливу тривалої гіперглікемії на гліальні клітини і визначено механізми ушкодження тканин мозку та сітківки ока за цих умов, а саме:

- Доведено, що гіперглікемія супроводжується підвищенням в 1,5-2 рази вмісту молекулярних маркерів астрогліозу, ушкоджень ДНК, апоптозу та регуляції генної експресії в ретині щурів
- Визначено, що реактивація астрогліозу, що спостерігається в сітківці щурів з тривалою гіперглікемією супроводжується зростанням вмісту поліпептидних фрагментів ГФКБ, що є маркером астрогліозу, а тому деградація цього протеїну може бути причиною збільшення проліферації та гіпертрофії клітин в сітківці гіперглікемічних щурів.

Вперше показані нейропротекторні ефекти гідратованого фулерену C_{60} в ретині щурів із стрептозотоцин-індукованою гіперглікемією, що спрямовані на попередження надмірної астрогліальної реактивності та активації апоптозу, і доведено, що споживання тваринами разом з питною водою фулерену C_{60} запобігає розвитку окисного стресу та виникненню ускладнень у сітківці ока та тканинах мозку.

6. Практичне значення роботи.

Отримані в роботі дані про шляхи ушкоджуючої дії тривалої гіперглікемії на гліальні клітини дають можливість зрозуміти ключові механізми, що залучені в патогенез діабетичної нейропатії та розвиток ретинопатії, і які можуть бути використані у викладанні практичних курсів з біохімії патологічних процесів та клінічної біохімії.

За результатами проведених досліджень визначено ефекти фулерену C_{60} на вміст ГФКБ, ПАРП та транслокацію NF- κ B до ядра клітин сітківки, які значно доповнюють сучасні уявлення щодо нейропротекторної дії гідратованого фулерену і відкривають перспективи у розробці гіпоглікемізуючих засобів нового покоління. На підставі отриманих результатів сформовано практичні рекомендації щодо застосування гідратованого фулерену C_{60} в якості нейропротектору за умов розвитку гіперглікемії, зокрема діабетичної ретинопатії.

7. Характеристика розділів, оцінка змісту дисертації, її завершеність у цілому.

Дисертаційна робота Прищепи І.В. викладена на 134 сторінках за загальноприйнятою схемою і містить анотацію українською та англійською мовою, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати власних досліджень та їх обговорення (2 розділи), узагальнення результатів, висновки та список літературних джерел із 129 найменувань.

Розпочинається робота з огляду літератури за темою дисертації, в якому проведений детальний аналіз наявних в літературі даних стосовно механізмів розвитку цукрового діабету та його ускладнень, наводиться характеристика кислого гліального протеїну (ГФКБ) та фулерену, а також представлено сучасні дані механізмів розвитку астрогліозу.

Для виконання роботи Ірина Володимирівна використовувала сучасні та адекватні методи дослідження: моделювання цукрового діабету шляхом введення стрептозотоцину за загальноприйнятою схемою, фізіологічні методи дослідження функціонального стану піддослідних тварин, імунохімічні та біохімічні методи, за допомогою яких досліджувався вміст глюкози, інсуліну, глікозильованого гемоглобіну, маркери апоптозу (каспаза-3, ПАРП та NF-κB), а також вміст, локалізація та деградація основного білка проміжних філаментів - гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ).

Розділ 3 присвячений дослідженню впливу гіперглікемії за умов стрептозотин-індукованого діабету на розвиток окисного стресу, вміст і склад ГФКБ, ПАРП, NF-κB та каспази-3. Цей розділ дуже логічно побудований. Спочатку дисертант доводить наявність тривалої гіперглікемії у тварин після введення стрептозотоцину, розвиток оксидативного стресу, визначає показники апоптозу клітин, після чого доводить збільшення кількості та ступеня деградації ГФКБ, що свідчить про розвиток астрогліозу у експериментальних тварин. Найбільш значущі знахідки цього розділу відображено у висновках 1-3.

У четвертому розділі представлено результати дослідження впливу фулерену на зазначені вище показники і доводиться його нейропротекторний ефект за умов тривалої гіперглікемії. Особливу увагу привертають результати дослідження впливу фулерену на стан гліальних клітин у сітківці ока, які переконливо свідчать про відновлюючу дію цього препарату на розподіл та стан ГФКБ, каспази-3, ПАРП та співвідношення вмісту NF-κB ядерної/цитозольної в ретині. Аналізуючи отримані дані, дисертант робить важливі висновки, суть яких полягає в наступному.

- Споживання фулерену C₆₀ з питною водою запобігає розвитку окисного стресу та істотно запобігає метаболічним порушенням в клітинах ретини, що визначається зниженням рівня всіх досліджених маркерів: ГФКБ - на 67%, ПАРП 1/2 – на 70%, каспази-3 – на 68%, співвідношення цитозольної фракції NF-κB до ядерної на 137%.
- Позитивна кореляцію змін вмісту маркерів астрогліозу, апоптозу та окисного стресу в ретині щурів за умов індукованої гіперглікемії свідчить про щільні взаємні зв'язки між цими процесами і обумовлює мультифакторний характер порушень за умов ретинопатії.

Виходячи з цих даних можна рекомендувати іншим дослідникам провести серію експериментів за підбором умов застосування та визначення оптимальних доз фулерену і визначити його переваги у порівнянні з іншими нейропротекторними препаратами.

Закінчується робота узагальненням, в якому Ірина Володимирівна на основі співставлення власних результатів з даними інших дослідників розробляє блок-схему антиоксидантної та нейропротекторної дії фулерену C₆₀ за умов тривалої гіперглікемії. Найбільш важливі результати дослідження відображені у 5 висновках.

Таким чином, робота є завершеним дослідженням, в якому науково обгрунтовані біохімічні механізми розвитку астрогліозу у тканинах мозку та сітківці ока за дії тривалої гіперглікемії і доведено нейропротекторні властивості фулерену C₆₀.

8. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і в авторефераті.

Наукові положення, висновки та рекомендації, що сформульовані в дисертації, викладені в опублікованих працях у повному обсязі: дисертантка є автором 20 наукових праць, з яких 6 статей у фахових вітчизняних та міжнародних періодичних виданнях (з них 3 реферовані в Scopus), та 14 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових з'їздів і конференцій.

Оформлення дисертації відповідає вимогам ВАК України до дисертацій, що подаються до захисту на здобуття ступеня кандидата біологічних наук, а зміст автореферату є ідентичним основним положенням дисертаційної роботи. Всі експериментальні дані, що наведені у дисертації, досить ретельно та критично проаналізовані, мають необхідну статистичну обробку і є достовірними.

Матеріали дисертаційної роботи Прищепи І.В. пройшли апробацію на наукових конференціях, з'їздах, конгресах, симпозіумах в Україні та за кордоном.

Принципових зауважень щодо дисертаційної роботи немає за виключенням того, що іноді в тексті зустрічаються орфографічні та стилістичні помилки. Недоліком оформлення також є відсутність посилань на авторів рисунків, що наводяться у літературному огляді, та обмеженість підписів до рисунків в розділі «Узагальнення результатів дослідження».

У порядку дискусії хотілось би почути від автора роботи відповідь на наступні питання:

1. Чим автор пояснює збільшення філаментної форми ГФКБ в різних відділах мозку за умов стрептозотоцин-індукованої гіперглікемії: підвищенням експресії або збільшенням деградації цього білку? Чи корелює вміст ГФКБ в різних відділах мозку зі ступенем його деградації?

2. Відомо, що гліковані білки не піддаються деградації, або повільніше розщеплюються за дією протеаз. А за даними цієї роботи – навпаки. Чим автор пояснює цей факт?
3. В роботі вказується на здійснення деградації ГФКБ під дією цитозольних протеаз. Чи є якісь власні, або літературні дані, які саме протеази можуть це здійснювати?
4. В роботі використано фулерен C_{60} , який переводили у водорозчинну форму шляхом обробки ультразвуком. Чи не порушується при цьому просторова структура фулерену? І як зрозуміти фразу на стор. 92 «Фізико-хімічні властивості фулеренів забезпечили **вбудову молекули фулерену C_{60} в молекулу води?**, завдяки чому створюється водне середовище, таке ж, як у здорових клітинах організму»?
5. Чи є дозо-обґрунтованим споживання фулерену з питною водою?
6. Як пояснити, в одному випадку автор зазначає, що фулерен не засвоюється організмом, а в іншому – що він вбудовується у мембрани?
7. Як можна пояснити протилежність ефектів фулерену: збереження гіперглікемічного стану на тлі підвищення рівня інсуліну у щурів зі стрептозотоксин-індукованим діабетом, який відповідає діабету 1 типу?
8. В роботі неодноразово згадується про існування позитивного кореляційного зв'язку між змінами маркерів метаболічного розладу з показниками гіперглікемічного стану, але жодного коефіцієнта кореляції ні в роботі, ні в авторефераті не наведено. На чому базується цей висновок?

Однак, зауваження та запитання, які виникли, не впливають на загальну високу оцінку роботи. Дисертанту вдалося повністю виконати усі завдання для досягнення поставленої мети. За обсягом, предметом та методами дослідження дисертація відповідає паспорту спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота « Стан проміжних філаментів астроглії, показники апоптозу та окисного стресу в тканині головного мозку і сітківці щурів за умов стрептозотоцин-індукованої гіперглікемії і дії фулерену C₆₀» за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів, можливістю практичного їх використання, коректністю та достовірністю зроблених висновків відповідає вимогам пп. 11, 12,13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567 зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, а її автор Прищепя Ірина Володимирівна заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент

професор кафедри біохімії та медичної хімії
ДЗ «Дніпропетровська медична академія
МОЗ України»,
доктор біологічних наук, професор

Підпис:  Шевцова А.І.
ДЗ «ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ»
12.11.2017 р.

