

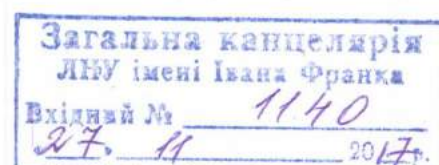
ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Горбулінської Олександри Вікторівни “ Біохімічні зміни в
клітинах крові щурів за умов введення екстрактів та суспензій якон
(*Smallanthus sonchifolius* роерр. & Endl.) за цукрового діабету 1-го типу ” подану на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 –
біохімія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Цукровий діабет (ЦД) є складною сучасною медико-соціальною проблемою у економічно розвинених країнах, пов'язаною здебільшого зі способом життя населення, та є високовитратною статтею охорони здоров'я (у США кожний один з 10 доларів на підтримання здоров'я витрачався на лікування діабету). Вивчення структурно-метаболических закономірностей функціонування червоної крові за цукрового діабету (ЦД) та його корекції є традиційним напрямком наукової діяльності на кафедрі біохімії ЛНУ імені Івана Франка. Робота, що виноситься на захист, продовжує серію досліджень, послідовно спрямованих на пошуки коректорів гіперглікемічного стану засобами природного походження – поліфенолами червоного вина, препаратами галеги лікарської, медичними грибами, а також агматином та іншими регуляторами обміну оксиду Нітрогену. Слід зауважити, що у кожного з цих чинників є пріоритетний напрямок корегуючої дії (антиоксидантна, гуанідій-детермінована, або, як у представленій роботі, – інулін-опосередкована дія на травлення та метаболізм вуглеводів). Позаяк, у кожному випадку дія рослинної сировини не обмежується певною молекулярною мішенню, а має переваги над синтетичними засобами, що визначаються, зокрема, полівалентністю та багатофакторністю. Більше того, актуальність такого дослідження зумовлена тим, що гіперглікемія має ширший діапазон чинників (стрес, численні захворювання), ніж ЦД, а рослина якон (*Smallanthus sonchifolius*) відома як природний регулятор рівню глюкози у крові завдяки високому вмісту інуліну. Відтак, пошук зваженої схеми фітотерапії на основі якону та біохімічних критеріїв її ефективності має велику теоретичну вагу та практичну актуальність. Обрання характеристик клітин крові у якості маркерного об'єкту є коректним завдяки їх чутливості до гіперглікемії та аналітичній доступності. Слід відзначити, що представлена робота належить до інтердисциплінарних наукових проєктів, пріоритетність реалізації яких визнається у наш час.

Зв'язок з державними і галузевими програмами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри за темою: “Розробка цукрознижувальних препаратів на основі біологічно активних речовин окремих лікарських рослин” (№ держреєстрації 0110U003147, 2010 – 2012рр.).

Наукова новизна одержаних результатів полягає у виявленні антиоксидантного ефекту препаратів якону на еритроцити та лейкоцити за ЦД, зменшення ознак генотоксичності та оптимізації рівня апоптичних процесів у лейкоцитах. Вперше доведено, що дія препаратів якону сприяє нормалізації адгезивних властивостей мембран еритроцитів та лейкоцитів завдяки протекторному впливу на структуру їх гліканових складових. Дисертантом доведено відсутність токсичного ефекту препаратів якону у здорових тварин.

Практичне значення і перспектива роботи зумовлені розробкою оптимальної концентрації та форми введення препарату якону за допомогою поверхнево-активних речовин біологічного походження та доведенням відсутності токсичного ефекту отриманого продукту. Дисертантом доведено, що отримана субстанція може бути основою для створення функціонального харчового продукту з гіпоглікемічною та антиоксидантною дією. Практичну цінність отриманих результатів засвідчує отриманий



патент на винахід основи для створення функціональних харчових продуктів чи препаратів комплексної терапії цукрового діабету (UA 112625).

Структура роботи

Дисертаційну роботу О. В. Горбулінської викладено на 207 сторінках (141 с. Основної частини) комп'ютерного набору. Вона побудована за традиційною схемою: складається зі вступу (стор. 20–26), аналітичного огляду літератури (стор. 27–59, 22,7% основної частини), матеріалів і методів дослідження (стор. 60–82), розділу, присвячених результатам власних досліджень (складається з десяти підрозділів, стор. 83–152), та їх обговоренню та узагальненню (стор. 153–168), завершується шістьма висновками та списком використаної літератури (349 найменувань, з яких 243 – англійською мовою). Співвідношення та обсяг окремих частин роботи відповідають вимогам до оформлення дисертації, затвердженим МОН України. Результати роботи проілюстровано 31 рисунком, 21 таблицею та одним додатком.

У *«Вступі»* автор обґрунтовує актуальність власного дослідження нагальною потребою пошуку ефективних гіпоглікемічних засобів для хворих на ЦД та значимістю лікарських рослин, зокрема інуліновмісних, у корекції цієї патології. На підставі цього дисертант обґрунтовує стратегію оцінки ефективності препаратів на основі якону як гіпоглікемічних та антиоксидантних чинників. Сформульовані завдання повністю розкривають поставлену мету. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

У *Огляді літератури* розглядаються молекулярні механізми діабету: механізми загибелі β -клітин підшлункової залози за умов цукрового діабету 1-го типу внаслідок аутоімунних процесів шляхом некрозу, або апоптозу (1.1.1); окисна деструкція як наслідок гіперглікемії (1.1.2), біохімічні та структурно-функціональні порушення клітин крові за умов ЦД, зокрема їх агрегаційної здатності (1.2, 1.3). Зміна складу та структури глікокон'югатів є важливим діагностичним показником у розвитку багатьох захворювань, зокрема, цукрового діабету, про що свідчить і досвід наукового колективу кафедри, який було би варто згадати у Огляді. У підрозділах 1.4 та 1.5 детально розглядаються біохімічні механізми гіпоглікемічної дії лікарських рослин та хімічний склад якона. Лікувальні властивості якона – гіпоглікемічну та антиоксидантну дію дисертант обґрунтовує наявністю у його складі фруктозанів (інулін) та поліфенольних сполук. Загалом, Огляд змістовний та охоплює аналіз сучасних джерел інформації з високим рівнем рецензування. Він свідчить про високий теоретичний рівень здобувача у аналізі ознак ЦД на молекулярному рівні.

У розділі *«Матеріали і методи дослідження»* подано детальний опис виготовлення препаратів на основі якону, схеми проведення експерименту на моделі ЦД та введення препаратів, а також методів дослідження. Було створено 6 груп тварин, у яких вивчали вплив лише різних препаратів якона та 6 груп тварин, у яких досліджували дію якону за ЦД. Відповідно було забезпечено дві контрольні групи (позитивний і негативний контроль). Дисертант використав широкий спектр класичних та сучасних методів дослідження антиоксидантно-прооксидантної рівноваги, визначення будови олігосахаридних фрагментів мембран, активності апоптозу.

Розділ *Результати досліджень* послідовно обґрунтовує вибір умов приготування препаратів якону, їх концентрацій та отримані результати щодо їх гіпоглікемічної дії та ефективності корегувальної дії на моделі ЦД. У підрозділі 3.1. автор демонструє результати розробки способів отримання стабільних субстанцій для функціональних харчових продуктів на основі порошку кореневих бульб якона (з додаванням біоПАР PS до суспензій порошку кореневих бульб якона та з додаванням до порошку якона біоПАР PS), що дають можливість отримати водні суспензії, які є седиментаційно стабільними. Подальші результати засвідчують, що увага, яка приділяється цій технології, виправдана тим, що засвідчує підготовчий етап дослідження, результатом якого стало отримання високоефективного препарату.

У підрозділі 3.2. дисертант описує власні результати визначення фітохімічного складу корневих бульб якона, чим підтверджує високий вміст інуліну, який в перерахунку на фруктозу становить 87,16 % від повітряносухої ваги рослинної сировини. Крім того, методом хроматомаспектрометрії у складі корневих бульб якона ідентифіковано широкий спектр вуглеводів, спиртів, гетероциклічних сполук, тощо (всього 23 компоненти з 33 зареєстрованих). Відтак, підтверджено потенційну здатність препаратів з якону проявляти високу біологічну активність.

Важливою складовою дослідження стало з'ясування оптимальних умов для реалізації гіпоглікемічного ефекту якону (Підрозділ 3.3). Отримані результати оцінювали за показниками тесту толерантності до глюкози. Вони показали, що навіть за одноразового введення якону одразу після навантаження глюкозою (с. 92) спостерігається істотне зниження глюкози, яке було зумовлено глюкозним навантаженням. Ці досліди стали підставою для обрання умов експерименту, а отже їх пояснення важливе, що не було обгрунтовано у роботі. Більше того, ефект одноразового введення якону цікавий і з точки зору практичних рекомендацій, адже є інформація про нефротоксичність тривалого введення якону (De Oliveira et al., 2011). Разом з тим, за курсового введення препарату якону вплив на вміст глюкози у крові був протилежним у здорових тварин та за ЦД. У здорових щурів якон підвищував рівень глюкози навіть на 80% (у групі К+Ек⁵⁰⁰), що, проте, не супроводжувалося підвищенням вмісту глікозилюваного гемоглобіну (за виключенням групи К+Ск). Цей ефект дисертант пояснює «присутністю у складі корневих бульб якона глюкози (2–5 % на суху речовину) (с. 103). На нашу думку, протилежний ефект якону у здорових та експериментальних тварин, який спостерігається у цьому та низці інших прикладах, потребує наступного системного вивчення на рівні регуляції метаболічних шляхів та з огляду на результати De Oliveira et al. (2011). Відтак, слід підкреслити, що гіпоглікемічну дію екстрактів листя та корневих бульб якона при курсовому введенні відзначено саме на моделі ЕЦД, причому стабілізована форма за допомогою поверхнево-активних речовини – продуктів біосинтезу культури *Pseudomonas sp.* PS-17 (біоПАР PS) виявляє більш виражений гіпоглікемічний ефект.

У наступних підрозділах подається цитологічна та біохімічна характеристика еритроцитів та лейкоцитів крові щурів. Ми не будемо зупинятися на порівнянні позитивного та негативного контролю: цей обов'язковий елемент дослідження не суперечать отриманим раніше у науковому колективі кафедри результатам). Щодо впливу якону було доведено (Підрозділ 3.4), що водні екстракти та стабілізована форма суспензії у дозі 500 мг/кг за умов ЕЦД здійснюють позитивний коригуючий ефект на систему еритрону, зумовлюючи зростання стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика, а також зменшення кількості ретикулоцитів та їх добової продукції. Застосування екстрактів листя та корневих бульб якона у дозі 500 мг/кг за умов ЦД призводить також до нормалізації показників лейкоцитарної формули за умов ЕЦД.

Без сумніву, аналіз прооксидантно-антиоксидантної рівноваги (Підрозділ 3.5) надає вагомі аргументи на користь застосування якону у корекції ЦД. Дисертантом доведено, що за курсового введення досліджуваних екстрактів та суспензій якона тваринам з ЕЦД відмічено їхні нормалізуючий вплив на стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги еритроцитів та лейкоцитів, що підтверджується зниженням утворення продуктів окисного ураження ліпідів та протеїнів, узгодженим зростанням активності ензимів антиоксидантного захисту. Дослідження фізико-хімічного стану мембран еритроцитів щурів за (Підрозділ 3.6) довело корегуючий вплив якону у високих дозах на кислотну резистентність еритроцитів.

У підрозділі 3.7. характеризується структура гліканових складових мембран еритроцитів. Слід відзначити, що глікозилювання мембранних протеїнів еритроцитів, що відбувається неензиматично, становить чутливіший індикатор гіперглікемії, ніж глікозилювання альбуміну або гемоглобіну (Olive et al., 2015). Очевидно, зміни у *N*- та *O*-сіалілюванні мембран еритроцитів, зокрема біохімічні модифікації спектрину, які спостерігаються за різних патологій (Samanta et al., 2011), проте і присутність

сіалілтрансфераз у сироватці може викликати зміни у сіалілюванні складових еритроцитарних мембран. Результати про нормалізацію під впливом препаратів якону у складі термінальних залишків сіалових кислот у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів, приєднаних як ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-, так і ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-зв'язками до субтермінальних моносахаридних ланок, а також співвідношення залишків манози у складі дисахаридної послідовності α, D -Man-1,6-D-Man та сіалових кислот та галактози, отримані автором, надзвичайно важливі, а їх інтерпретація з використанням сучасної інформації про діагностичну роль сіалілювання мембранних складових (у Розділі «Аналіз...») демонструє високий рівень ерудиції автора.

Дані щодо фагоцитарної активності нейтрофілів та їх мієлопероксидазної активності та вмісту катіонних протеїнів (Підрозділ 3.8) свідчать, що вплив препаратів якону проявляється у тварин з ЦД та інтактних протилежним чином (рис. 3.21). При курсовому введенні водних екстрактів листя і кореневих бульб якона у дозі 70 та 500 мг/кг та суспензії кореневих бульб якона у дозі 500 мг/кг відмічено зростання фагоцитарної здатності і НАДФН-оксидазної активності нейтрофілів та зниження мієлопероксидазної активності у тварин з ЦД.

У лейкоцитах периферичної крові було відзначено позитивний коригуючий вплив екстрактів та суспензій якону у дозі 500 мг/кг на вміст фрагментованої ДНК та співвідношення кількості білків p53 та Bcl-2 у тварин з ЕЦД (Підрозділ 3.9). Дисертант підкреслює взаємозв'язок між апоптичною активністю та структурою глікокаліксу лейкоцитарних мембран, причому відщеплення залишків ацетилнейрамінової кислоти у термінальних ділянках супроводжується демаскуванням цукрів, які знаходяться в субтермінальній позиції, що є сигналом для впізнавання та захоплення апоптотичних лейкоцитів макрофагами.

Розділ 4 «Обговорення результатів дослідження» виконано у кращих традиціях аналітичних оглядів і засвідчує наукову ерудицію автора. У ньому послідовно обговорюється місце встановлених закономірностей у системі сучасних знань щодо механізмів ураження крові за діабету та ймовірних механізмів їх корекції під впливом продукції на основі якона з огляду на особливості хімічної композиції рослинної сировини та їх доступності в процесі травлення. При цьому у аргументації використовуються сучасні джерела інформації, встановлюються логічні взаємозв'язки між досліджуваними характеристиками. Особливо імпонує аналіз гліканового стану мембран. Результати аналізу вдало проілюстровано узагальнюючою схемою впливу водних екстрактів та суспензій якона на зміни біохімічних показників в клітинах крові у здорових тварин та тварин з ЕЦД (Рис. 4.1.), на якій указано також, які саме складові якону гіпотетично можуть здійснювати гіпоглікемічний, антиоксидантний чи антиапоптичний ефект. Проте, як слушно відзначає автор (с. 155), «...дія екстрактів і суспензій якона може бути зумовлена унікальною комбінацією біологічно активних речовин». Слід відзначити, що у сучасній літературі висвітлюється вплив якону на адсорбцію глюкози у периферійних тканинах, пригнічення гліоклінеогенезу, корекція толерантності до інсуліну у печінці та збільшення його секреції у панкреасі (Caetano et al., 2016). Отримані результати та їх інтерпретація узгоджуються та суттєво доповнюють цю інформацію щодо оптимізуючої дії якона за ЦД.

Автор формулює шість висновків, які відображають сутність отриманих результатів. На нашу думку, було би доречно зробити висновки більш конкретними - із специфікацією умов, концентрацій чинників, біохімічних маркерів та виду експериментальних тварин.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій. Сформульовані положення та висновки ґрунтуються на експериментальних даних, отриманих з дотриманням стандартних вимог до відбору проб та наявності контрольних груп. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже, ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

Недоліки по змісту і оформленню:

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є ряд питань дискусійного характеру та зауважень до оформлення.

1. Формулювання Об'єкту та Предмету дослідження занадто деталізовані (у формулюванні Об'єкту уточнюється про шляхи корекції яконом, а Предмет дослідження повинен визначати тему дисертаційної праці, тобто власне конкретизувати об'єкт як дію якона, а не давати перелік характеристик).

2. В Огляді літератури дисертант не уникнув хрестоматійності та надлишкової інформації, наприклад у 1.1.2 це факти про роль редокс-ланцюга мітохондрій у продукуванні радикалів кисню за старіння (Cadenas et al., 2000; Sastre et al., 2000). Подана інформація щодо окисного стресу та антиоксидантів не адаптована щодо їх особливостей за ЦД. Недостатньо конкретизовано роль глюкози та (у випадку інсуліну) фруктози як ініціаторів прооксидантних процесів. Позаяк підрозділ містить надлишкову інформацію: «Глутатіонпероксидаза за своєю структурою є білком – металоферментом...». Стверджується, що надмірна продукція супероксид-аніону або пероксиду гідрогену супроводжується депресією ділянок гену, які відповідають за активність ферментів антиоксидантної ланки (що це за ген і що це за ділянки?). Недоречні посилання до цієї тези: Герасимов та інш у Бюлл. експер. биол. мед. – 1977. та тези Kashiwagi et al., 1996 - (Suppl 3:S84-86). На противагу абзац, що стосується конкретно ролі у передачі сигналу під час апоптозу протеїнів p53 та Bcl-2. (1.2.3. с 43) залишився без посилань.

3. У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» наявна занадто розлога деталізація тривіальних лабораторних методів. Варто було обґрунтувати вибір концентрації глюкози у крові щурів, обраний як такий, що відповідає гіперглікемії, ґрунтуючись на даних літератури щодо рівня глюкози у крові щурів, наприклад (Wang et al., 2010, Estimation of the normal range of blood glucose in rats; Vasudevan and McNeil, Biomaterials, 2007. Chronic cobalt treatment decreases hyperglycemia in streptozotocin-diabetic rats). Натомість недоцільно подавати занадто деталізований опис хрестоматійних методів з рекомендаціями щодо зберігання реактивів, побудови калібрувальної кривої за методом Лоурі (с. 73) та обрахунку клітин крові.

4. Постановка скринінгового дослідження не була висвітлена у Розділі «Матеріали і методи» та у підпису до Рис. 3.7, що ускладнює оцінку відповідних результатів.

5. На нашу думку, у роботі, представленій до захисту за спеціальністю «Біохімія», інформація, присвячена технологічним питанням виготовлення субстанцій та аналізу їх складу, повинна міститися у Додатках, а не у Результатах.

6. При Аналізі результатів певні факти не знайшли належної аргументації: гіпоглікемічний ефект якона за одноразового введення та протилежний ефект за низкою показників крові у здорових тварин та з індукованим ЕЦД за курсового введення. Непроаналізовані можливі негативні наслідки вживання якона, які, наприклад спостерігались у цитованій роботі (De Oliveira et al., 2011).

7. Некоректні вирази, недбалості у пунктуації. Наприклад, 1.1. Сучасні аспекти патогенезу ... - насправді - Сучасні аспекти розуміння патогенезу ...; Назва Табл. 3.7. – насправді «динаміка змін не вивчалась», крім того, за методом Тімірбулатова визначається не вміст ТБК-активних продуктів, а індукція їх утворення; Цитування № 157 «Schatz» - насправді Schatz; С 113 «окислення Cu^{2+} , кофактора СОД»; У підписах Рис. 3.11 - 3.15 слід давати спочатку загальну назву рисунку, а тоді деталізувати назви його окремих складових (А, Б). У підрозділі 3.3. у підписах рисунків слід деталізувати кмови (за разового чи курсового введення). С 98 - штучна точність у описі відмінностей - на 28,47 % та на 54,04 %, незначне зниження (С. 130). У примітці до Рис. (3.21 та інш) незрозуміло * - різниця вірогідна порівняно з контролем – це порівняно з негативним контролем чи відповідним контролем (К+Е...)? Слід указати звідки запозичено рис. 1.1.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. Дисертація відповідає вимогам МОН України. Результати проведених автором досліджень повністю відображені у 16 публікаціях, у тому числі 5 статтях у фахових виданнях, 10 – матеріали і

тези доповідей на з'їздах і конференціях та 1 патент України на винахід. Зміст автореферату відображає структуру і положення дисертації, які виносяться на захист.

В цілому дисертація О. В. Горбулінської є завершеною роботою, яку відзначає послідовність і цілеспрямованість у вирішенні конкретного питання біохімії – з'ясування структурно-функціональних характеристик клітин крові за цукрового діабету та впливу препаратів лікарської рослини якону. Дисертант проявив високий рівень володіння сучасними експериментальними методами біохімії, клітинної біології та аналітичної хімії, обізнаність із сучасною науковою літературою по темі дослідження. Одержані результати відкривають нові можливості у корекції гіперглікемічних станів та діагностиці ефективності цих заходів.

На основі вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота Горбулінської Олександрі Вікторівни “ Біохімічні зміни в клітинах крові щурів за умов введення екстрактів та суспензій якона (*Smallanthus sonchifolius* роерр. & Endl.) за цукрового діабету 1-го типу ” за актуальністю проблеми, методичними підходами, зробленими висновками, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів є завершеною науковою працею і відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою N 526 Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 стосовно кандидатських дисертацій за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Професор кафедри хімії
та методики її навчання
Тернопільського національного
педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка
доктор біологічних наук



16.11.2017 р

О.Б. Столяр

