

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу І.В.Прищепи
**«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»,** подану на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04– біохімія

Актуальність теми.

Згідно сучасних наукових поглядів гіперглікемія, у результаті якої посилюються процеси, що опосередковують порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу, є основним молекулярним механізмом виникнення діабетичних ускладнень. Проблема лікування цукрового діабету на сьогоднішній день залишається невирішеною. Інсулінотерапія та контроль рівня глюкози за допомогою синтетичних цукрознижувальних препаратів на даний час є основними засобами лікування ЦД. У сучасній медичній практиці широко використовується гіпоглікемічні препарати, але всі вони мають ряд негативних ефектів. Це обґрунтовує пошук та створення нових ефективних і водночас малотоксичних антидіабетичних засобів.

На фоні гіперглікемії активується низка внутрішньоклітинних метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого відбувається надмірне утворення активних форм Оксигену (АФО). АФО ініціюють процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), одониткові та двониткові розриви ДНК. Активні форми Оксигену також призводять до дезінтеграції внутрішньої мітохондріальної мембрани, що викликає втрату мітохондріального трансмембранного потенціалу, набрякання матриксу з наступним розривом зовнішньої мембрани мітохондрій та вивільненням проапоптотичних білків (AIF, Smac, прокаспаза 9, цитохром с) із міжмембранного простору в цитозоль. Вихід цитохрому с призводить до різкого підвищення внутрішньоклітинного вмісту АФО і активації каспазного каскаду. Характерним також є підвищення внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію, транслокація фосфатидилсерину з плазматичної мембрани.

Нервові клітини є найбільш вразливими до окисних ушкоджень. Одним з найбільш поширених ускладнень діабету є ретинопатія.

Враховуючи основні патогенетичні механізми, що беруть участь у розвитку хронічних ускладнень цукрового діабету, обґрунтованим терапевтичним підходом для лікування та профілактики цього захворювання є використання препаратів з антиоксидантною дією.

Виходячи із вищесказаного, вважаю, що тема дисертації І.В.Прищепи «СТАН ПРОМІЖНИХ ФІЛАМЕНТІВ АСТРОГЛІЇ, ПОКАЗНИКИ АПОПТОЗУ ТА ОКИСНОГО СТРЕСУ В ТКАНІНІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ І СІТКІВЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ І ДІЇ ФУЛЕРЕНУ C_{60} » є актуальною і має не лише значний теоретичний інтерес, але й практичну цінність.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими програмами.

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

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.

Новизна дослідження та одержаних результатів визначається системністю дослідження, що дозволило провести комплексний аналіз змін у головному мозку та сітківці щурів за умов розвитку гіперглікемії та споживання гідратованого фулерену C_{60} . Показані нейропротекторні ефекти гідратованого фулерену C_{60} в сітківці щурів із стрептозотоцин-індукованою гіперглікемією на попередження надмірної астрогліальної реактивності, активації апоптозу, ПАРП і NF- κ B. Встановлено, що споживання тваринами разом з питною водою фулерену C_{60} запобігає розвитку окисного стресу в сітківці, що проявляється зниженням вмісту ТБК-реактивних продуктів на 57% відносно групи тварин з СТЗ-індукованою гіперглікемією. За результатами дослідження виявлена позитивна кореляція змін вмісту молекулярного маркера реактивації астроцитів ГФКБ в сітківці щурів з СТЗ-індукованою гіперглікемією і тварин з гіперглікемією, які споживали фулерен C_{60} з питною водою. Експериментально доведено, що споживання фулерену C_{60} з питною водою запобігає метаболічним порушенням в клітинах сітківки. Зокрема, вміст всіх досліджених маркерів був нижчий за показники СТЗГ групи: ГФКБ на 67%, ПАРП на 70%, каспаза-3 на 68%, співвідношення ядерної фракції NF- κ B до цитозольної у 1,6 рази.

Практичне значення одержаних результатів.

Практичне значення результатів дослідження полягає у тому, що виявлені ефекти фулерену C_{60} на вміст ГФКБ, ПАРП та транслокацію NF- κ B до ядра клітин сітківки свідчать про стримування надмірної реактивації гліальних клітин в сітківці щурів з гіперглікемією. На підставі отриманих результатів сформовані практичні рекомендації щодо застосування гідратованого фулерену C_{60} в якості нейропротектора за умов розвитку гіперглікемії, зокрема діабетичної ретинопатії. Отримані в роботі дані дають додаткову інформацію для більш детального вивчення впливу гіперглікемії на астрогліальну реактивацію, механізми клітинної загибелі в мозку та сітківці, що дозволяє використовувати їх у викладанні практичних курсів з біохімії патологічних процесів та клінічної біохімії.

Апробація результатів дисертації.

Одержані експериментальні дані широко апробовані. Основні наукові положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на українських та міжнародних конференціях: на наукових семінарах та звітних конференціях кафедри біофізики та біохімії Дніпровського національного університету (Дніпропетровськ, 2013-16), науково-практичній конференції з міжнародною участю (Дніпропетровськ, 2013), регіональній студентській науково-практичній конференції (Дніпропетровськ, 2013), а також на 13-й міжнародній міждисциплінарній науково-практичній школі-конференції (Одеса, 2013), VI міжнародному конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2014), міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів (Львів, 2013-2016), 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels (Isparta, 2016, Turkey), International conference on biology science (Konya 2016, Turkey).

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях у наукових фахових виданнях, які включені в перелік, затверджений ДАК України за біологічним напрямом (з них реферовані в Scopus – 3), а також у 14 тезах доповідей у збірниках вітчизняних та міжнародних симпозіумів та конференцій.

Структура дисертації.

Дисертація викладена на 134 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, огляду літератури (1 розділ), описів матеріалів та методів

досліджень (1 розділ), результатів досліджень та їх обговорення (2 розділи) які, правда, мають не зовсім чітку структурованість і не зовсім вірну рубрикацію, узагальнення результатів досліджень (1 розділ), висновків та списку використаних джерел. Робота містить 53 рисунки, 4 формули та 3 таблиці. Перелік використаної літератури включає 129 джерел.

У «**Вступі**» автор обґрунтовує актуальність власного дослідження. Сформульовані завдання повністю відповідають поставленій меті і розкривають її. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

Розділ 1 «(літературний огляд)» складається з підрозділів, які не мають чіткої рубрикації, але треба відзначити, що вони містять фундаментальні відомості про предмет дослідження, необхідні для подальшого кваліфікованого обговорення результатів. Значну увагу приділено даним про роль окисного стресу в розвитку патології нервової системи, про використання антиоксидантів в якості нейропротекторів, а також описані маркери апоптозу при діабетичній ретинопатії.

Розділ 2 «**Матеріали та методи дослідження**» свідчить про експериментальну майстерність та професійний рівень дисертанта. Використано коректні умови постановки експерименту, які дозволяють реалізувати поставлені завдання.

Розділ 3 «**Результати дослідження**» складається із двох структурованих підрозділів.

Інтерпретація фактів, отриманих дослідником, є важливим елементом роботи. У даній дисертації їй присвячено **Розділ 5**. «Узагальнення результатів дослідження», в якому, на мою думку, досить скупо подається обговорення основних підсумків роботи.

За результатами дисертаційної роботи зроблено 5 **висновків**.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій.

Сформульовані положення, висновки та рекомендації ґрунтуються на експериментальних даних, одержаних з дотриманням стандартних вимог до утримування тварин, на великій кількості повторностей в експерименті. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Оцінюючи, в загальному, позитивно рецензовану роботу, у мене до неї є деякі зауваження. Крім того, при читанні роботи виникають питання дискусійного характеру, на які хотілось би почути відповідь автора. Так:

1. До термінології. Я вважаю недоцільним вживання дефініції (навіть винесеної у назву роботи) «**стрептозотоцин-індукована гіперглікемія**». В роботі йдеться про модель, яка вже використовується не один десяток років – це модель стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету 1-го типу. Не зрозуміло, чому треба було змінювати цю назву з наголосом лише на один, хоч і основний, клінічний прояв цієї моделі – гіперглікемію. Продовжуючи тему термінології, хочу зазначити, що автор послуговується застарілою назвою для класифікації видів діабету : «інсулін-залежний та і інсулін-незалежний» типи діабету. Така класифікація у сучасній літературі не рекомендується. Це цукровий діабет 1-го та 2-го типів.

2. Дуже претензійно звучить твердження про те, що в роботі «**Вперше проведений комплексний аналіз змін загального стану організму..... за умов розвитку гіперглікемії**». При цьому йдеться лише про зміну ваги тварин. До речі, зміни цього показника трактуються не зовсім вірно, що свідчить про необізнаність автора дисертації з літературою по цьому питанню, яке, поза всяким сумнівом, є дуже важливим для інтерпретації отриманих даних. В роботі сказано: «.... наприкінці досліду вага тварин СТЗГ групи була нижчою у 1,6 рази відносно контролю. Це може бути наслідком руйнування β -клітин підшлункової залози та ймовірним розвитком панкреатиту. Виникає хронічна втрата ваги, навіть при звичному режимі харчування. Втрата маси тіла відбувається тому, що організм не виділяє достатньої кількості панкреатичних ферментів для перетравлення їжі, тому поживні речовини не здатні повноцінно всмоктуватись кишківником. Погане травлення призводить до недостатності харчування за рахунок виділення жирів разом з каловими масами». Це не так!!! Насправді ж, втрата маси тіла в початковому періоді розвитку цукрового діабету відбувається головним чином через виділення з організму хворого рідини, яке обумовлене осмотичним діурезом, викликаним гіперглікемією. Розвивається зневоднення організму. Хворі увесь час відчують спрагу і багато п'ють, щоб знизити концентрацію глюкози в плазмі. Це у свою чергу посилює навантаження на нирки, що є першопричиною розвитку нефропатій. Згодом відбувається втрата маси тіла при ЦД 1-го типу в результаті втрати енергії, яка надійшла з їжею, через глюкозурію і через генералізовані гормональні порушення, що характерні для цього захворювання. Нестача інсуліну і надлишок глюкагону призводять до порушення синтезу білків і жирів, а також одночасно викликають прискорення протеолізу та ліполізу, так що обмін речовин набуває характеру катаболізму. Втрата маси тіла при діабеті часто супроводжується навіть підвищеним споживанням їжі.

3. Цитата: «Враховуючи отримані результати, можна стверджувати, що **розвиток гіперглікемії** призводить до **підвищення вмісту NF- κ B в сітківці** та його транслокації з цитоплазми до ядра. Однією з важливих властивостей транскрипційного фактору NF- κ B є його **здатність захищати клітини від апоптозу**. Таким чином можна зробити висновок, що відбувається захисна клітинна відповідь на окисні ушкодження, які асоційовані з активацією експресії групи генів ферментів антиоксидантного захисту.» Чи не хвилює Вас той факт, що у сусідніх розділах Ви стверджуєте : «Отримані результати дають підстави зробити висновок, що окисний стрес призводить до надмірної активації ПАРП та **зростання вмісту активованої каспази-3**. Тобто, за умов гіперглікемії активується окисне пошкодження ланцюгів ДНК. Враховуючи той факт, що каспаза-3 є одним з ключових ферментів апоптозу, то можна стверджувати про певний зв'язок між окисними ушкодженнями та активацією механізмів загибелі астроцитів **за умов розвитку гіперглікемії.**» **ОТОЖ ГІПЕРГЛІКЕМІЯ І ЗАХИЩАЄ ВІД АПОПТОЗУ, І ПОСИЛЮЄ ЙОГО.** У якому, на Вашу думку, механізмі задіяний транскрипційний фактор NF- κ B при гальмуванні процесів апоптозу в клітинах за ЦД 1-го типу ?

4. Як методично отримували матеріал для аналізу співвідношення ядерної і цитоплазматичної фракції фактора NF- κ B?

5. Робота рясніє непідтвердженими експериментальними висновками, як от: «Рівень інсуліну у крові СТЗГ та СТЗГ+С₆₀ груп тварин з гіперглікемією зрілого віку був нижчий за контрольну групу у 1,5 та 1,4 рази відповідно (P>0,05). **Отриманий результат може відображати тенденцію часткового відновлення β -клітин островків** (а потрібно – острівців) **Лангерганса за дії С₆₀НуFn**». Такі висновки потрібно підтверджувати гістологічними дослідженнями, а їх у роботі немає.

6. Які, на Вашу думку, молекулярні механізми лежать у основі зміни складу поліпептидних фрагментів гліального фібрилярного кислого білка у відділах мозку та зразках сітківки шурів групи з СТЗ-індукованим ЦД та зразків тварин групи з ЦД, що отримували фулерен разом з питною водою?

7. Часто опоненти говорять, що в рецензованій роботі забагато висновків. У цьому випадку – навпаки. Я вважаю, що із багатого експериментального матеріалу, отриманого при виконанні цієї роботи, можна зробити більше висновків. Натомість, перший висновок потрібно було б видалити. Він характеризує лише параметри отриманої моделі, які вже описані у десятках статей. Вони, звичайно, повинні контролюватися як рутинні контрольні показники, але у висновках даються досягнення саме цього дослідження, які мають наукову новизну. Інші висновки мають констатуючий характер і не аналізують механізми зафіксованого явища, що хотілося б побачити у висновках до роботи.

8. У роботі зустрічаються граматичні і стилістичні помилки, а також невдалі у мовному та науковому сенсі вирази: «Аналіз імуноблотингу показав значну **підвищену регуляцію вмісту каспази-3** в сітківці тварин з гіперглікемією в порівнянні з контрольною групою тварин»; «Окисний стрес може привезти до **некрозу клітин [15] через апаптоз**»; «За результатами

визначення рівня активації ПАРП (визначався вміст, а не активація) можна зробити висновок, що окисний стрес, який відбувається в наслідок розвитку гіперглікемії, призводить до **активації розщеплення ПАРП** в ретині щурів з СТЗ-індукованим діабетом. Тобто, за умов розвитку гіперглікемії **відбувається окисне пошкодження ланцюгів ДНК (як це експериментально доведено?)**, що призводить до розвитку діабетичної ретинопатії» - повний сумбур!

Однак, всі зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку. Проблема, яку досліджує автор дисертації, надзвичайно важлива, а одержані нею дані вносять вклад у з'ясування мультифакторності характеру порушень за умов ретинопатії, про що свідчить комплексність і взаємозалежність змін вмісту маркерів астрогліозу, апоптозу та окисного стресу в сітківці щурів за умов індукованої гіперглікемії. Отримані у роботі дані мають важливе фундаментальне та практичне значення.

Висновок.

Враховуючи все сказане вище, вважаю, що опонована робота **Прищепи Ірини Володимирівни «СТАН ПРОМІЖНИХ ФІЛАМЕНТІВ АСТРОГЛІЇ, ПОКАЗНИКИ АПОПТОЗУ ТА ОКИСНОГО СТРЕСУ В ТКАНИНІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ І СІТКІВЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕПТОЗОЦИН-ІНДУКОВАНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ І ДІЇ ФУЛЕРЕНУ C₆₀»**, присвячена важливій науковій і практичній проблемі, є завершеною науковою працею, що за актуальністю проблеми, теоретичним рівнем, методичним забезпеченням, науковою новизною та практичним значенням результатів досліджень відповідає вимогам до кандидатських дисертацій п.п. 11, 12, 13 положення “Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, а її автор, **Прищепка Ірина Володимирівна**, заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04– біохімія.

**Завідувач кафедри біохімії
Львівського національного університету
імені Івана Франка,
доктор біологічних наук,
професор**

Підпис професора Сибірної Н.О. завіряю.
Вчений секретар Львівського національного
Університету імені Івана Франка, доцент

Н. Сибірної

Сибірної Н.О.

Грабовецька О.С.

