

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу В.А.Ткаченко

«ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ЗАПОБІГАННЯ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ МІОКАРДА», подану на

здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

за спеціальністю 03.00.04– біохімія

Актуальність теми.

Серед численних хвороб, які можуть вразити наше серце, однією з найбільш частих є ішемічна хвороба серця (ІХС). Наслідки можуть бути дуже сумні - від втрати працездатності до смерті. Поряд з інсультом, ішемічна хвороба серця відповідальна за 90% смертей в країнах Європейського континенту. В Україні смертність від хвороб серця та системи кровообігу у 2-4 рази вища ніж у країнах ЄС та світу, причому в нашій країні вмирають від цих захворювань не лише частіше, але й переважно у молодому віці. До числа чинників, що провокують розвиток ІХС, належать активні форми кисню (АФК), рівень яких стрімко зростає при ішемії, що провокує процеси переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Втрата рівноваги між про- та антиоксидантною системами у клітинах серцевого м'яза та судинному ендотелії є основою розвитку окисного стресу (ОС), що супроводжується окисною модифікацією білків (ОМБ). ОС пов'язують з утворенням активних карбонільних сполук. Формування кінцевих продуктів глікації (КПГ) раніше пояснювали тривалою гіперглікемією, що спостерігається за цукрового діабету, але окремі роботи свідчать, що вони задіяні у патогенезі інших захворювань, не пов'язаних з цукровим діабетом. Встановлена роль КПГ у патогенезі кардіоренального синдрому, але досліджень, присвячених ролі ОМБ та КПГ у розвитку ІХС недіабетичного походження, практично немає.

Накопичення ОМБ може не лише змінювати властивості протеїнів, а й запускати окремі механізми сигналювання після їхньої взаємодії з рецепторами. Серед таких рецепторів варто уваги галектин-3 (AGE-R3), який бере участь у розвитку атеросклеротичних змін судинного ендотелію. Підвищення рівня цього лектину розглядають як маркер ускладнень гострого інфаркту міокарда та фактор високого ризику смерті. Однак відомостей стосовно взаємозв'язку AGE-R3 з рівнем КПГ та ОМБ за серцево-судинної патології ще не було описано, хоча такі дані можуть мати велике значення в діагностиці і моніторингу ефективності терапевтичних заходів у хворих після гострого інфаркту міокарда.

Оскільки ішемія міокарда пов'язана з генеруванням АФК та активацією процесів ОМБ, значна увага приділяється пошуку препаратів, що можуть

проявляти кардіопротекторні властивості за рахунок гальмування зазначених процесів або активації знешкодження токсичних продуктів карбонільно-окисного стресу (КОС). У цьому плані цікавим є тетрацикліновий антибіотик доксициклін, що здатний інгібувати активність матриксних металопротеїназ та протеоліз у позаклітинному матриксі. Разом з тим присутність у його структурі багатозаміщеного фенольного кільця може забезпечити нейтралізацію вільних радикалів. В опонованій роботі була висунута гіпотеза про здатність цього препарату пригнічувати КОС дозозалежним способом. Зважаючи на вищесказане, актуальним напрямком є дослідження показників КОС та їхнє коригування при експериментальній ішемії міокарда, оцінка впливу антиоксидантів та кардіопротекторних препаратів на ці показники і обґрунтування гіпотези про роль КОС в розвитку серцево-судинних захворювань недиабетогенного походження.

Виходячи із вищесказаного, вважаю, що тема дисертації В.А.Ткаченко «ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ЗАПОБІГАННЯ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ МІОКАРДА», 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 в лабораторії біохімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» в межах кафедральної науково-дослідної роботи «Посттрансляційні зміни (модифікації) білків за умов патологічних процесів» (номер держреєстрації 0114U001279) та держбюджетної теми «Визначення ефективності терапії та ризику ускладнень у хворих з артеріальною гіпертензією, різними формами ішемічної хвороби серця на основі оцінки посттрансляційних модифікацій білків» (номер держреєстрації 0114U001280).

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.

Новизна дослідження та одержаних результатів визначається системністю дослідження, що дозволило провести комплексний аналіз змін неферментативної модифікації білків (окисної модифікації білків та рівня кінцевих продуктів глікації) у щурів з експериментальною ішемією міокарда. Це дозволило висунути та обґрунтувати положення про патогенетичне значення карбонільно-окисного стресу в розвитку ІХС на тлі нормального рівня глюкози. Вперше встановлено, що за короткотривалої дії адреналіну, порушується протеазно-інгібіторний баланс у крові та серцевому м'язі. У

плазмі крові щурів достовірно підвищується відносна активність ММП9, а у фракції розчинних білків серцевого м'яза, навпаки, вірогідно збільшується активність ММП2 і не визначається ММП9. Ці зміни спостерігаються на тлі зниження в крові рівня найбільш потужного інгібітора протеолізу – α 2-макроглобуліну та збільшення у два рази концентрації α 1-інгібітора протеїназу у серці. У плазмі щурів з пітуїтрин-ізадринним ушкодженням міокарда (ПШУМ) достовірно збільшується активність латентної та зрілої форм ММП2.

Дослідження впливу антиоксидантів (корвітину, аміногуанідину та 2-оксоглутарату), різних доз тетрациклінового антибіотика доксицикліну та антагоніста альдостерону еплеренону на активність антиоксидантних ферментів, ступінь карбонільної модифікації протеїнів в субклітинних фракціях лівого шлуночка та співвідношення ТБК/КПГ доводить, що коригування зазначених показників є невід'ємною частиною кардіопротекторної дії цих препаратів. Вперше встановлено, що низькі дози доксицикліну знижують рівень продуктів карбонільної модифікації протеїнів та індекс окисного стресу до нормальних значень. Цікавим є той факт, що ефекти малих доз доксицикліну порівняльні або перевищують дію класичних антиоксидантів – аміногуанідину та корвітину. Це на думку автора обумовлює ефективність цього препарату у запобіганні фіброзування тканин та формування постінфарктної серцевої недостатності.

Аналіз вмісту галектину-3 (AGE-R3) у плазмі експериментальних тварин, дозволив встановити існування його моно-, ди-, три- та тетрамерних форм і довести перерозподіл зазначених форм за пітуїтрин-ізадринної ішемії міокарда та за дії досліджуваних в роботі препаратів. Показано, що під дією антиоксидантів та доксицикліну знижується вміст усіх форм AGE-R3, за виключенням тетрамерної, рівень якої вірогідно підвищується. Антагоніст альдостерону еплеренон, навпаки, підвищує вміст мономерів AGE-R3 на тлі зменшення олігомерних форм.

Практичне значення одержаних результатів.

Практичне значення результатів дисертаційної роботи полягає у тому, що виявлені феномени можуть бути використані у клінічній медицині, оскільки отримані дані дозволяють певним досліджуваним параметрам надати статус додаткових маркерів у діагностиці та моніторингу серцево-судинних захворювань і їх метаболічно обґрунтованої терапії. Матеріали дослідження можуть бути корисними при оцінці рівня AGE-R3 методом ELISA, який дозволяє визначити лише загальний пул цього лектину без урахування його олігомерних форм, в той час як імуноблотинг дає можливість визначити розподіл різних форм і оцінити його КПГ-рецепторну активність. Результати роботи впроваджено в наукові дослідження, що виконуються на кафедрах внутрішньої медицини 3 та ревматології ДЗ «ДМА

МОЗ України». За результатами роботи отримано патент на корисну модель. Запатентовані показники дозволяють оцінювати рівень КПП у клінічних лабораторіях. Матеріали досліджень використовуються при викладанні курсу біохімії ДЗ «ДМА МОЗ України» у розділі «Функціональна біохімія» та спецкурсу «Біохімічні основи дії лікарських засобів».

Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертації були представлені на II-й та IV-й Республіканських науково-практичних конференціях «Современные достижения молодых учёных в медицине» (Гродно, Республіка Білорусь, 2015, 2017), Міжнародній науковій конференції «Молодь та поступ біології» (Львів, 2015 (диплом за найкращу стендову доповідь, I місце), II та III Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015, Дніпро, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, Республіка Білорусь, 2016), XI Міжнародній конференції студентів та молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016), VIII Lviv-Lublin conference of «Experimental and clinical biochemistry» (Lublin, 2017), XVIII National Congress of Cardiologists of Ukraine, Ukrainian Journal of Cardiology (Kiev, 2017), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії» (Харків, 2018), I-й Білорусько-польсько-литовській науковій конференції «Frontiers in Life Science. Signalling and Metabolism» (Гродно, 2018).

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

За темою дисертації опубліковано 20 робіт, серед яких 10 статей (8 – у наукових фахових виданнях, одна з яких – у зарубіжному виданні, що цитується у Scopus) та 10 тез доповідей у матеріалах наукових з'їздів, вітчизняних та міжнародних конференцій, а також отримано 1 патент на корисну модель.

Структура дисертації.

Дисертацію викладено на 156 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 35 рисунками та 11 таблицями. Список літератури налічує 241 найменування.

Дисертація містить такі розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, обговорення результатів досліджень та їх узагальнення, висновки та список використаних 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 «Огляд літератури» складається з 4 підрозділів, які мають чітку рубрикацію і містять фундаментальні відомості про предмет дослідження і необхідні для подальшого кваліфікованого обговорення результатів. Значну увагу приділено даним про роль карбонільно-окисного стресу в розвитку патології, а також про шляхи запобігання окисній модифікації білків.

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 чотирьох структурованих підрозділів.

Інтерпретація фактів, отриманих дослідником, є важливим елементом роботи. У даній дисертації їй присвячено **Розділ 4 «Обговорення результатів досліджень та їх узагальнення»**, в якому подається обговорення основних підсумків роботи.

За результатами дисертаційної роботи зроблено 8 **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 позитивно рецензовану роботу в цілому, 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: Цитата: «Аналіз галектину-3 (AGE-R3) ????(напевно йдеться про вміст даного білка), який може виступати як **скавенджер-рецептор КПП**, у плазмі експериментальних тварин...»(кінець цитати). Вживання терміну «скавенджер-рецептор КПП» по відношенню до AGE-R3 вважаю некоректним, оскільки SR-рецептори (скавенджер-рецептори до КПП) мають чітку класифікацію і описаний цикл функціонування, які

відрізняються від таких для AGE-R3, основною функцією якого є передача сигналу.

2. При описі Моделі №2 і виділених експериментальних груп тварин на стор. 58 сказано, що «... щури 5-ої групи отримували 1% розчин 2-оксоглутарату у питній воді протягом 6 днів. Кожна тварина споживала 5-6 мл 2-ОГ-розчину на добу». З наших спостережень тварини випивають більше, ніж 5-6 мл на добу. Чому взагалі не було проведено введення зондом, як це було зроблено для інших препаратів, щоб не було питань до дозування?

3. Одним з найбільш вивчених інгібіторів глікозилювання білків є аміногуанідин, інгібітор ключової стадії процесу-радикальної реакції Мейларда. На його основі ще у 20-тих роках минулого століття розроблені протидіабетичні препарати – бігуаніди, один із яких – метформін, використовується дотепер, хоча клінічні випробування аміногуанідину виявляють його недостатню ефективність і наявність побічних ефектів. Автор дисертації згадує про те, що аміногуанідин ще є і специфічним інгібітором індукцибельної NO-синтази. У зв'язку з цим у мене питання: Чому Ви не спробували визначити активності різних ізоформ NO-синтази, а також вміст стабільних метаболітів оксиду азоту – нітритів та нітратів? Адже на фоні розвитку оксидативного стресу, без сумніву, підвищується вміст супероксиданіон радикалу, який у першу чергу реагує з оксидом азоту з утворенням пероксинітриту – окиснювача №1 у біологічних системах. На сторінці 101 у дисертації сказано: «Найбільш суттєве зниження ІОС було зафіксоване у щурів на тлі приймання аміногуанідину, що пояснюється його впливом не тільки на окисну модифікацію, але і на процеси не ферментативної глікації білків». Висновок правильний (хоч, на мою думку, трішки не так розміщені смислові акценти), але маючи дані активності iNOS, рівень NO_2^- та NO_3^- , Ви б могли підтвердити те, що аміногуанідин справді у ваших запропонованих модельних ситуаціях знижував рівень основного гравця – пероксинітриту, на полі оксидативного стресу. І це б дало розуміння біохімічного механізму дії запропонованого чинника.

4. Цікаво було б почути про побічні дії доксицикліну, адже Ви використовували його у високих дозах.

5. Аналізуючи зміст розділів 3 «Результати досліджень» та 4 «Обговорення результатів досліджень та їх узагальнення», хочу зауважити, що Розділ 3 краще було б назвати «Результати досліджень та їх обговорення», а розділ 4 - «Узагальнення» або «Аналіз та узагальнення результатів досліджень». Фактично у опонованій дисертації Розділ 3 має елементи обговорення, які часто повторювалися у розділі 4, а от ґрунтового узагальнення отриманих результатів в розділі 4 фактично немає. Воно замінене ще однією констатацією отриманих даних.

6. Констатація без достатнього узагальнення і спроби з'ясування механізмів дії досліджуваних чинників прослідковується і у Висновках. Цікавим би був узагальнюючий висновок про практичне застосування отриманих результатів.

7. На схемі, яка наведена у кінці розділу 4 і , без сумніву, є дуже корисною для розуміння отриманих результатів, вказано гіпотетичні точки впливу застосованих речовин, але докладного біохімічного механізму їхньої дії не обговорюється.

8. У роботі зустрічаються граматичні і стилістичні помилки, а також невдалі у мовному та науковому сенсі вирази: «призводить до збільшення експресії олігомеризації», «різноспрямованість змін каталази», «на фоні незначного підвищення глюкози» - вирази не коректні у науковому сенсі; «виступаючи у якості завади» - вираз невдалий у мовному сенсі; «корегування», «ступень», і т.д.

Однак, всі зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку. Проблема, яку досліджує автор дисертації, надзвичайно важлива. На підставі отриманих результатів запропонована схема запобігання окисній модифікації білків за дії антиоксидантів (корвітину, аміногуанідину та 2-оксоглутарату), а також різних доз тетрациклінового антибіотика доксицикліну та антагоніста альдостерону - еплеренону. Отримані у роботі дані мають важливе фундаментальне та практичне значення.

Висновок.

Враховуючи все сказане вище, вважаю, що опонована робота Ткаченко Вікторії Андріївни «ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ЗАПОБІГАННЯ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ШЕМІЇ МІОКАРДА», 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, Ткаченко Вікторія Андріївна, 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

Сибірня Н.О.

Грабовецька О.С.

