

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Білої Івонни Іванівни «Вплив агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів за експериментального цукрового діабету» подану до захисту у спеціалізовану вчену раду К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

Актуальність обраної теми.

Цукровий діабет – захворювання, яке характеризується гіперглікемією, що виникає внаслідок дефекту секреції або дії інсуліну. Хронічна гіперглікемія за цукрового діабету (ЦД) призводить до пошкодження та дисфункції різних органів, особливо очей, нирок, нервів, серця і кровоносних судин. Мікро- і макроангіопатії, які розвиваються за умов діабету, поряд із прискореним прогресуванням атеросклерозу, супроводжуються порушенням кровообігу, підвищеним тромботичним ризиком та є причинами смерті людей, хворих на діабет. Ангіопатії, які виникають за ЦД залежать від морфофункціонального стану лейкоцитів, який визначається комплексною взаємодією між білками мембрани, цитоскелетом і мережею внутрішньоклітинного сигналювання. Однією з причин зміни процесу полімеризації-деполімеризації актину в лейкоцитах крові за умов ЦД є розвиток оксидативно-нітративного стресу. В умовах стресу надмірне окиснення протеїнів призводить до руйнування F-актину цитоскелету, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів. Однак, розвиток оксидативно-нітративного стресу в клітинах периферичної крові за умов ЦД може попередити агматин (4-амінобутилгуанідин) – продукт декарбоксилювання L-аргініну. Одним із основних біологічних ефектів агматину є здатність впливати на метаболізм глюкози за умов її підвищеної концентрації. Тому з'ясування механізмів впливу агматину на агрегаційну та

міграційну здатність лейкоцитів крові при ЦД є актуальним напрямком, який може лягти в основу розроблення і створення препаратів з гіпоглікемічною, антиоксидантною та імуномодуючою дією.

Дисертаційну роботу виконано у рамках науково-дослідної роботи кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені І. Франка за темою: Бх-47Ф «Біохімічні механізми розвитку, діагностики та корекції діабетіндукованого оксидативно-нітративного стресу».

Метою даної роботи було дослідження впливу агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету, шляхом визначення змін показників оксидативного стресу та процесів полімеризації-деполімеризації актинових філаментів. Завдання досліджень сформульовані методично грамотно, вони побудовані з урахуванням показників, які в повній мірі відображають суть роботи, що дозволило автору досягти поставленої мети.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Основні наукові положення дисертації випливають з отриманих результатів експериментальних досліджень, вони ґрунтуються на глибокому аналізі та узагальненні одержаних результатів. Зокрема, дисертанткою з'ясовано вплив агматину на окремі показники оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах периферичної крові щурів за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету у щурів. Отримані результати вказують на відновлення редокс-гомеостазу та балансу ензиматичної ланки антиоксидантного захисту в лейкоцитах крові тварин за введення агматину на фоні ЕЦД. У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні загального зниження рівня актину процес його полімеризації інтенсифікується. Введення агматину тваринам хворим на діабет виявляє коригуючий вплив на полімеризацію актину

в лейкоцитах. Дисертанткою вперше досліджено вплив агматину на перерозподіл фракцій актину, після їхньої преінкубації із сіалоспецифічним лектином WGA за умов ЕЦД.

Основні положення дисертації науково обґрунтовані, достовірність яких підтверджена експериментальними даними і висновками, що приведені у дисертації та авторефераті.

Дисертацію викладено українською мовою на 147 сторінках. Загальна структура роботи побудована згідно вимог “Положення” ДАК України і містить усі необхідні структурні елементи: анотацію, список опублікованих праць за темою дисертації, зміст, перелік умовних скорочень, вступ та розділи дисертації – огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел. Робота містить 22 рисунки і 2 таблиці.

На початку роботи представлена **анотація** на українській (2-8 ст.) та англійській мовах (8-14 ст.), де стисло викладені основні результати досліджень, їх наукова новизна та практичне значення. Наводиться список публікацій здобувача за темою дисертації, який включає 15 праць (14-17ст.).

Основна частина дисертації включає: вступ, розділи дисертації та висновки.

У **вступній частині** (23-28 ст.) дисертації автор представляє науковий аналіз та обґрунтування вибраної теми, її актуальність, наводить зв'язок роботи з державною науковою тематикою, ставить мету і завдання досліджень, розкриває наукову новизну одержаних результатів, їх практичне значення, висвітлює особистий внесок здобувача та апробацію матеріалів дисертації, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У **розділі 1** Огляд літератури (29 – 55 ст.), який включає 5 підрозділів, дисертантка представила та глибоко проаналізувала літературні джерела, що

стосуються етіології, генетичних передумов виникнення та патогенезу цукрового діабету 1-го типу, зміни структури та функціональних властивостей лейкоцитів, реорганізації їх актинового цитоскелету як основи міграційної здатності, виникнення оксидативного, нітративного та карбонільного стресів за умов цукрового діабету, а також метаболічних ефектів агматину – ендогенного катіонного аміну, що утворюється у результаті декарбоксілювання L-аргініну.

Літературні публікації проаналізовані та викладені у списку використаних джерел дисертації. Наукова оцінка проведеного аналізу літературного огляду дає підстави вважати, що Біла І.І. добре володіє сучасною науковою літературою та здобула достатній обсяг знань з напряму досліджень за темою дисертаційної роботи.

Проведений аналіз **розділу 2** «Матеріали і методи досліджень» (56-71 ст.) показав, що експериментальна частина дисертаційної роботи виконана на безпородних білих щурах-самцях масою 150-180 г. ЕЦД викликали внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину, в кількості 60 мг/кг маси тіла тварини. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові. Починаючи з 3-го дня після індукції діабету тваринам внутрішньом'язово вводили агматин у концентрації 20 мг/кг протягом 14 днів. Тварини були поділені на 4 групи: перша – контроль (К), друга – контрольні тварини, яким вводили агматин (К + Агм), третя – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД), четверта – тварини з ЕЦД, яким вводили агматин (ЕЦД + Агм).

У процесі виконання роботи використані сучасні біохімічні, молекулярно-біологічні, цитологічні та статистичні методи.

У **розділі 3** представлені результати досліджень отримані дисертанткою (ст. 72-102).

Встановлено, що за умов ЕЦД вміст кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах зменшувався, а у плазмі збільшувався, порівняно з контролем, що можна пояснити збільшенням вмісту глюкози у плазмі крові діабетичної групи

тварин. На фоні введення агматину хворим тваринам виявлено зростання вмісту кінцевих продуктів глікації в лейкоцитах, та зменшення їхньої кількості у плазмі, порівняно з діабетичною групою. Це пов'язано із здатністю агматину викликати активацію I2-рецепторів мозкового шару наднирників, що призводить до підвищення секреції β -ендорфіну, який активує μ -опіоїдні рецептори, а це стимулює засвоєння глюкози периферичними тканинами.

У результаті проведених дисертанткою досліджень встановлено, що введення агматину тваринам з експериментальним цукровим діабетом спричиняло зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів та підвищення активності каталази, СОД, ГПО, ГР, а також вмісту GSH порівняно з діабетичною групою. Після введення агматину тваринам з діабетом встановлено незначне підвищення вмісту кінцевих продуктів оксидації у лейкоцитах та достовірне зменшення їхньої кількості у плазмі порівняно з діабетом, що пов'язано з гіпоглікемічною дією агматину. Отримані результати свідчать, що агматин сприяє відновленню порушених функцій ферментів антиоксидантної системи лейкоцитів крові тварин за умов ЕЦД.

Дисертанткою встановлено, що причиною зростання показників WGA-індукованої агрегації лейкоцитів тварин, яким вводили агматин є збільшення вмісту термінальних залишків N-ацетил- β -D-глюкозаміну та сіалових кислот у складі мембранних глікокон'югатів лейкоцитів, що зумовлено посиленням процесу сіалювання олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів та послабленням десіалювання, а також прямою дією досліджуваного поліаміну на стан поверхневих глікокон'югатів мембрани лейкоцитів або на активність ферментів, які формують структуру вуглеводних детермінант адгезивних молекул цих клітин.

Методами флюоресцентної мікроскопії та імуноблот-аналізу дисертанткою встановлено зростання вмісту полімеризованого актину в лейкоцитах крові тварин з експериментальним цукровим діабетом. На фоні

підвищення загального рівня F-актину зменшувалася кількість довгих актинових філаментів цитоскелету, водночас зростав вміст коротких філаментів актину, що свідчить про преактивований стан лейкоцитів. Зміна рівня полімеризації та деполімеризації актину в лейкоцитах у разі ЕЦД може вказувати на порушення у системі активації, хемотаксису, міграції та фагоцитозу. Дисертантка довела коригуючий ефект агматину на функціональний стан лейкоцитів, що підтверджується інтенсифікацією процесу формування довгих філаментів актинового цитоскелету.

У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення агматину динаміка формування відповіді на стимулювальний вплив лектину WGA характеризувалася інтенсифікуванням полімеризації актину фракції філаментів цитоскелету вже на 0,5 хв впливу лектину, дуже стрімким процесом деполімеризації на 1 хв після дії лектину та повернення показників до рівня у вихідному стані у разі дії лектину впродовж 3 хв. За вказаних умов у лейкоцитах афінність зв'язування сіалоглікокон'югатів із комплементарними лігандами та трансдукція лектиніндукованого сигналу, який обумовлює реорганізацію актинового цитоскелету, майже досягали показників реорганізації актину в активованих лейкоцитах контрольної групи тварин. Отримані дисертанткою результати свідчать, що агматин позитивно впливав на функціональний стан лейкоцитів тварин з ЕЦД. Очевидно, нормалізація рівня глюкози у тварин з ЕЦД у відповідь на введення агматину є одним з механізмів, який опосередковує такі функціональні зміни в лейкоцитах за умов ЕЦД. У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення агматину трансдукція лектиніндукованого сигналу через сіалоглікокон'югати і динаміка кількісного перерозподілу вмісту фракцій актину вказує на те, що даний поліамін сприяє відновленню і підтриманню структури поверхневих глікокон'югатів, що відповідають за формування функціональної відповіді лейкоцитів на активаційні сигнали.

Розділ 4 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» (ст.103-120)

містить аналіз одержаних результатів власних досліджень з обговоренням виявлених змін основних показників. Дисертанткою показано, що агматин проявляє антиоксидантну, гіпоглікемічну та імуномодулюючу дію і може бути застосований при корекції патологічних станів, що супроводжуються гіперглікемією, оксидативно-нітративним стресом і розладом локомоторної функції імунокомпетентних клітин. Доведено позитивний коригуючий вплив агматину на процеси полімеризації-деполімеризації актину, що опосередковують динаміку змін структурно-функціонального стану лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету.

Оцінюючи матеріали цього розділу необхідно відзначити наукову глибину аналізу отриманих даних, викладені в дисертаційній роботі результати достатньо науково опрацьовані у порівнянні з даними літератури. Проведений аналіз результатів власних досліджень та їх узагальнення у цьому розділі дало можливість дисертантці зробити науково-обґрунтовані висновки.

Шість висновків, що приведені у дисертації (ст. 121-122) та авторефераті (ст. 13-14) узагальнюють і достатньо повно висвітлюють одержані результати та основні положення дисертації.

Список використаних джерел (ст. 123-144) містить 230 публікацій, причому близько 50% з них – це література за останні 10 років.

Є один додаток (ст. 145-147), що включають список публікацій здобувача за темою дисертації.

Повнота викладу результатів досліджень в опублікованих працях.

Детальний аналіз дисертаційних матеріалів, проведений у період їх рецензування, свідчить, що наукова робота Білої Іванни Іванівни є підсумком завершених досліджень, які впродовж періоду їх виконання всебічно аналізувалися і висвітлені у 15 наукових працях, серед яких 5 статей (з них 4 – опубліковані у фахових українських періодичних виданнях та 1 – у закордонному) і 10 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій. Основні

положення дисертації науково аргументовані та в повній мірі відображені в наукових статтях.

Дисертація та автореферат оформлені на належному науковому рівні, написані державною мовою. Автореферат дисертації за змістом ідентичний дисертаційній роботі та висвітлює основні її положення.

Висловлюючи позитивну оцінку дисертаційної роботи в цілому, необхідно зробити окремі зауваження, що були виявлені в період її аналізу:

1. У розділі 3 «Результати досліджень» міститься значний обсяг обговорення отриманих результатів та літературних даних, що більше відповідає розділу 4 «Аналіз та узагальнення результатів досліджень».
2. Незрозуміло, з якою метою підсумки після кожного підрозділу 3 розділу виділені як пункти, причому вони не відображені у змісті дисертації; є помилки у їх нумерації.
3. На рис. 3.7 (ст.82), табл. 3.2 (ст 85), рис.3.14 (ст. 96), у тексті (ст. 98) і рис. 3.16 А, Б, В і Г (ст.99) позначення другої та третьої груп не відповідають схемі досліджень у 2 розділі.

У процесі аналізу дисертаційної роботи виникли деякі запитання до здобувача:

1. Чим можна пояснити зростання ступеня та швидкості WGA-індукованої агрегації лейкоцитів як за дії агматину, так і за умов ЕЦД?
 2. Як Ви можете пояснити зростання вмісту полімеризованого актину в лейкоцитах крові тварин з ЕЦД на тлі зменшення кількості довгих актинових філаментів цитоскелету?
 3. Який механізм дії агматину на динаміку кількісного перерозподілу вмісту фракцій актину за лектиніндукованого сигналу?
 4. Чому для досліджень взято саме агматин? Чи можна на основі результатів Ваших досліджень рекомендувати агматин для застосування його у медичній практиці при лікуванні ангіопатій за ЦД?
- Виявлені недоліки та упущення суттєво не впливають на науковий і

методичний рівень дисертаційної роботи, а тому не зменшують теоретичного і практичного значення одержаних результатів та дисертації в цілому.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи й автореферату Білої Івонни Іванівни на тему «Вплив агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів за експериментального цукрового діабету» необхідно відзначити, що робота є самостійною завершеною науковою працею, в якій викладені нові експериментальні дані щодо впливу агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету. Дисертаційна робота за актуальністю тематики досліджень, обсягом і науково-методичним рівнем їх виконання, новизною і практичним значенням одержаних результатів та викладених положень відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 року, що ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор Біла Івонна Іванівна заслуговує здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

Офіційний опонент

Доктор біологічних наук, ст. н. співробітник,
заступник директора з наукової роботи
Інституту біології тварин НААН,
завідувач лабораторії біохімії
адаптації та онтогенезу тварин



Р. Я. Іскра

Підпис Р. Я. Іскри засвідчую:
головний фахівець ВК
Інституту біології тварин НААН,
канд. с.-г. наук



І. В. Невоструєва

15.08.2019 р.