ВІДГУК
офіційного опонента на дисертацію Білої Іванни Іванівни «Вплив агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів за експериментального цукрового діабету» подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми. Дисертаційна робота Білої Іванни Іванівни присвячена актуальній тематиці сучасної біохімії – вивченню впливу агматина на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД), шляхом визначення змін показників оксидативного стресу та процесів полімеризації-деполімеризації актинових філаментів. Автор дисертації акцентує про зміни динаміки процесу полімеризації-деполімеризації актину в лейкоцитах крові за умов ЕЦД в наслідок розвитку оксидативно-нітративного стресу. Відомо, що за умов стресу надмірне окиснення протеїнів призводить до руйнування F-актину цитоскелета, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів. Дисертаційна робота є продовженням досліджень кафедри біохімії Львівського національного університете імені Івана Франка щодо розвитку оксидативно-нітративного стресу в клітинах периферичної крові за умов ЦД та можливості превентивного захисту за допомогою агматина (4-амінобутил-гуанідина). Авторка вірно вказує на те, що дослідження механізмів впливу агматину на агрегацію та міграційну здатність лейкоцитів крові при ЦД є пріоритетними та актуальними, а отримані результати можуть сприяти розробці нових підходів у створенні препаратів з гіпоглікемічною, антиоксидантною та імуномодуюючою дією.

Об`єктом дослідження обрано агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину.

Предмет дослідження: оксидативно-нітративний та карбонільний стреси, процеси полімеризації актину, ферменти системи антиоксидантного захисту лейкоцитів, продукти перекисного окиснення ліпідів, агрегація лейкоцитів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно комплексного плану наукових досліджень кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка за темами: "Механізми корекції метаболічних порушень клітин системи крові за умов цукрового діабету 1-го типу" (номер держреєстрації 0113U003046), термін виконання 2013–2015 роки та "Біохімічні механізми розвитку, діагностики та корекції діабетіндукованого оксидативно-нітративного стресу" (номер держреєстрації 0117U001225), термін виконання 2017–2019 роки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій.

Узагальнення автором літературних даних за обраною тематикою дозволяє добре зрозуміти актуальність проблеми та адекватність сформульованої мети та задач дисертаційного дослідження. Послідовність експериментальних досліджень, сучасні методи, що застосовані, цілком відповідають вирішенню поставлених задач. Зроблені автором висновки логічно базуються на власних експериментальних даних. Все це свідчить про обґрунтованість наукових положень, висунутих дисертанткою й дозволяють вважати, що отримані висновки мають як фундаментальну, так і практичну доцільність у сучасній біохімії.

Достовірність одержаних результатів обумовлюється розумно підібраними групами тварин з відтворенням експериментального цукрового діабету та впливу агматину, у порівнянні як з інтактними тваринами, так і з ЕЦД. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм з варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента.

Оцінка дисертації щодо її змісту та оформлення.

Схема побудови роботи традиційна, викладено такі розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки» та

«Список використаних джерел» та «Додаток 1». Дисертацію викладено на 147 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 22 рисунками та 2 таблицями. Список літератури включає 230 найменувань.

В огляді літератури автором детально проаналізовані світові дані відносно етіології, генетичної передумови виникнення та патогенезу цукрового діабету 1-го типу. Схарактеризовані патофізіологічні механізми розвитку ЦД 1-го типу. Детально презентовані структура та функціональні властивості лейкоцитів у нормі та за умов ЦД 1-го типу та виникнення оксидативного, нітративного та карбонільного стресів за даних умов. Надана характеристика метаболічних ефектів агматину. У цілому розділ написаний лаконічно з порівнянням різних експериментальних даних вітчизняних та світових науковців. Дисертантка продемонструвала високий рівень обізнаності за обраною тематикою.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» наведені сучасні підходи проведення експериментальних досліджень. Необхідно відмітити, що автором застосовано експериментальне моделювання *in vivo* ЦД 1-го типу, а також методи біохімічні (визначення активності ензимів, вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, вмісту відновленого глутатіону, кінцевих продуктів глікації та оксидації білків), молекулярно-біологічні (флюоресцентно-мікроскопічне дослідження процесу полімеризації актину, вестерн-блот аналіз), цитологічні (світлова мікроскопія), статистичні (метод варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента)

Результати та їх обговорення представлені у розділах 3 та 4 власних експериментальних досліджень, які проведені на високому науково-методичному рівні. Власні результати презентовані у розділі 3, який має логічно побудовані 5 підрозділів.

На першому етапі дисертантка визначила:

3.1. Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів глікації (AGEs) у лейкоцитах та плазмі периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД.

За умов ЕЦД вміст кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах зменшувався, а у плазмі збільшувався, порівняно з контролем, що пояснено збільшенням вмісту глюкози у плазмі крові діабетичної групи тварин. На фоні введення агматину хворим тваринам спостерігали зростання вмісту кінцевих продуктів глікації в лейкоцитах, та змешення їхньої кількості у плазмі, порівняно з діабетичною групою, що пов'язано із здатністю агматину викликати активацію I_2-рецепторів мозкового шару наднирників, що призводить до підвищення секреції β-ендорфіну, який активує μ-опіоїдні рецептори, а це стимулює засвоєння глюкози периферичними тканинами.

3.2. Дослідження впливу агматину на стан показників оксидативного стресу у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД, шляхом визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), вмісту кінцевих продуктів оксидації білків (AOPPs) та активності ферментів системи антиоксидантного захисту.

У результаті проведених досліджень встановлено, що введення агматину тваринам з експериментальним цукровим діабетом спричиняє зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів на 20 % та достовірне підвищення активності ферментів антиоксидантної системи: каталази, СОД, ГПО, ГР, а також вмісту GSH порівняно з діабетичною групою. Після введення агматину тваринам з діабетом спостерігали 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.

Зроблено висновок, що агматин сприяє відновленню порушених функцій ферментів антиоксидантної системи лейкоцитів крові тварин за умов ЕЦД.

3.3. Визначення впливу агматину на функціональний стан лейкоцитів крові щурів у нормі та за умов ЕЦД шляхом дослідження WGA-індукованої агрегації клітин.

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 адгезивніх молекул цих клітин.

3.4. Дослідження процесів полімеризації-деполімеризації актину у лейкоцитах щурів для оцінки міграційної здатності імунокомпетентних клітин крові у всіх досліджуваних групах.

Методами флюоресцентної мікроскопії та імуноблот-аналізу встановлено зростання вмісту полімеризованого актину в лейкоцитах крові тварин з експериментальним цукровим діабетом. На фоні підвищення загального рівня F-актину зменшується кількість довгих актинових філаментів цитоскелету, водночас зростає вміст коротких філаментів актину, що свідчить про преактивований стан лейкоцитів. Доведено коригуючий ефект агматину на функціональний стан лейкоцитів, що підтверджується інтенсифікацією процесу формування довгих філаментів актинового цитоскелету.

3.5. Вплив агматину на трансдукцію лектиніндукованих сигналів через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів щурів у нормі та за умов ЕЦД, які викликають реорганізацію структурних елементів цитоскелету лейкоцитів.

Встановлено, що 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 стуктури поверхневих глікокон'югатів, що відповідають за формування функціональної відповіді лейкоцитів на активаційні сигнали.

Для фахівців найцікавішим є розділ 4 із аналізом та узагальненням результатів дослідження. Підсумковий аналіз отриманих результатів наведений на схемі причинно-наслідкового впливу досліджуваних показників на рис. 4.1.

Дисертаційна робота Білої Іванни Іванівни є цілісним завершеним дослідженням, результати добре апробовані, за матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах (серед них Фізіологічний журнал. (IF – 0.06, Scientific Journal Rankings – 0.130), та Open Life Sciences (IF – 0,583, Scientific Journal Rankings – 0,266, закордонне видання) та 10 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах, конгресах.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Проте можна висловити деякі зауваження та питання дискусійного характеру до дисертантки, які суттєво не впливають на значимість представленої роботи:

1. У методах вказано, що «Після електрофоретичного розділення лізатів клітинних фракцій здійснювали перенесення білків з ПААГ під дією електричного поля на нітроцелюлозну мембрану [132, 133] з наступною обробкою отриманих блотів антитілами. Перенесення проводили протягом 2 год при силі струму 250 мА. Чим обґрунтований такий термін перенесення?
2. Чи проводився кореляційний аналіз між отриманими дослідними даними?
3. Чи є вплив агматину на вміст AGEs у лейкоцитах та плазмі суто за рахунок активації μ-опіоїдних рецепторів? Які дані підтверджують це?
4. Чи є дані яким чином агматин впливає на біохімічні показники крові та лейкоцитів за умов тривалого застосування для тварин та людини за нормальних умов та цукрового діабету II типу?
5. Як агматин впливає на класичну на лектин-залежну активацію системи комплементу за нормальних умов?

7

6. Які практичні рекомендації дисертантка може зробити на базі отриманих результатів, чи запатентовані дані стосовно позитивного впливу агматину?
7. Є мінорні помилки, й бажано застосовувати єдині правила оформлення посилань у тексті та у списку відповідно обраного стилю.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Загалом дисертаційна робота справляє добре враження, актуальність, новизна, обгрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність не викликає сумнівів. Робота має теоретичне й практичне значення. Одержані новітні дані про позитивний коригуючий вплив агматину на процеси полімеризації-деполімеризації актину, що опосередковують динаміку змін структурно-функціонального стану лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету. Отримані результати доповнюють існуючі уявлення про біохімічні складові патогенезу цукрового діабету I типу. Дисертація є закінченим науковим дослідженням. Головний зміст дисертації віддзеркалений в авторефераті.

Враховуючи вище викладене, вважаю, що дисертація Білої Іванни Іванівни «Вплив агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів за експериментального цукрового діабету» відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України про «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння звання старшого наукового співробітника», що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Зав. кафедри біохімії та фізіології
Дніпровського національного
університету імені Олеся Гончара,
док-р. біол. наук (03.00.04-біохімія), проф. Ушакова Г.О.