

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Сушко Ольги Олександрівни
«Метаболічні процеси в організмі щурів за дії цитратів ванадію та хрому на тлі експериментального цукрового діабету», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія

Дисертаційна робота Сушко О.О. виконана згідно наукових планів Інституту біології тварин НААН та є фрагментом науково-дослідної роботи лабораторії біохімії адаптації та онтогенезу тварин, яка включала три етапи: «Вивчити біологічні особливості дії цитратів мікроелементів в різні періоди онтогенезу тварин», «Вивчити дію цитрату ванадію на фізіолого-біохімічні процеси в організмі тварин» та «Дослідити комплексну дію цитратів ванадію та хрому на резистентність та адаптаційну здатність тварин».

Актуальність теми

Дисертаційна робота Сушко Ольги Олександрівни присвячена з'ясуванню впливу цитратів ванадію та хрому, які синтезовані із використанням нанотехнологій, на окремі ланки вуглеводного і ліпідного обміну, стан системи антиоксидантного захисту у досліджуваних тканинах щурів за цукрового діабету (ЦД) з метою пошуку нових підходів для профілактики та лікування цього захворювання та його ускладнень.

На даний час актуальною медико-соціальною проблемою профілактики та лікування цукрового діабету ЦД, як 1-го, так і 2 типу, який супроводжується численними ускладненнями, є проблема пошуку нових методичних підходів для розробки ефективних препаратів, які б не володіли побічними наслідками.

Розвиток та перебіг ЦД супроводжується такими поширеними ускладненнями, як серцево-судинні, які нерідко призводять до атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, тромбоутворення, а також нефропатія, ретинопатія, нейропатія та інші, механізми які лежать в їх основі залишаються остаточно не з'ясованими.

Одним із найпоширеніших ендокринних захворювань є цукровий діабет, для якого характерною є гіперглікемія, що виникає внаслідок відносної чи абсолютної недостатності інсуліну, або ж розвитку інсулінорезистентності до дії гормону. Патогенез ЦД 1 типу переважно є опосередкований Т-клітинами автоімунний процес, який супроводжується прогресивним руйнуванням β -клітин клітин підшлункової залози, в результаті чого виникає дефіцит інсуліну. За ЦД 2 типу переважно виникає резистентність клітин, тканин та органів до інсуліну. До розвитку цукрового діабету призводять різні чинники, зокрема генетична схильність, фактори оточуючого середовища, такі як різного походження харчові антигени, токсини, вірусні інфекції і навіть стреси. Разом із тим, наразі не існує ефективних засобів лікування як ЦД, так і його численних ускладнень. Більше того, не дивлячись на широкий спектр застосування різних антидіабетичних препаратів, зокрема інгібіторів альдозоредуктази, протеїнкінази С, мітоген-активованих протеїнкіназ, ангіотензин перетворюючого ензиму тощо,

ефективність яких досить часто при лікуванні була незначна, ці інгібітори нерідко призводили до побічних наслідків. На теперішній час продовжується пошук ефективних препаратів для лікування ЦД, причому перевагу мають сполуки природного походження, а також макро- та мікроелементи, які можуть бути не тільки кофакторами ензимів, але також їх алостеричними регуляторами тим самим забезпечуючи, нормалізацію, принаймні часткову, ключових метаболічних процесів вуглеводів, ліпідів та протеїнів. Однак, не всі макро- та мікроелементи, які застосовують при лікуванні ЦД, зокрема цинк та магній, досліджені у достатній мірі, а також не з'ясовано на які конкретні метаболічні процеси вони можуть впливати та чи здатні вони знижувати концентрацію глюкози в крові, пригнічувати оксидативний стрес та забезпечувати злагоджене функціонування ензимної і неензимної ланок системи антиоксидантного захисту.

Існують дані, які свідчать про те, що Mg^{2+} -залежні ензими, у яких магній є кофактором також можуть бути конкурентно регульовані іонами ванадію, зокрема VO^{2+} , а тривалентний Хром (Cr), біологічно активною формою якого в організмі є хромодулін, здатен посилювати дію інсуліну шляхом його впливу на рецептори гормону за ЦД 2 типу. Використання есенціальних елементів Хрому та Ванадію в якості нутрієнтів вже знайшло застосування для лікування ЦД 2 типу та метаболічного синдрому, що сприяє зниженню концентрації глюкози в крові. В зв'язку з тим, що на ЦД 1 типу переважно хворіє молодь, а на пізніх стадіях ЦД 2 типу стає ЦД 1 типу, тому з'ясування механізмів дії цих мікроелементів за ЦД 1 типу є надзвичайно актуальною проблемою сьогодення, вирішення якої дозволить застосовувати їх у клініці лікування цього захворювання. Разом із тим, ці мікроелементи можуть бути токсичними для організму, що обумовлює необхідність проведення досліджень їх впливу у різних концентраціях на ключові метаболічні процеси в організмі за наявності ЦД. За багатьох патологій, у тому числі і ЦД, розвивається недостатність цих елементів, проте при їх введенні в організм слід використовувати їх в таких дозах, які б не призводили до виникнення побічних наслідків.

Актуальність досліджуваної проблеми полягає в тому, що з року в рік зростає кількість хворих на ЦД та його ускладнення, що нерідко призводить до втрати працездатності, інвалідності та навіть смертності. На даний час проблема лікування ЦД в Україні потребує нових підходів та розробки ефективних препаратів, оскільки біля 1,5 мільйона осіб хворіють на це захворювання. Гіперглікемія «запускає» розвиток багатьох патогенетичних процесів, які в свою чергу, викликають метаболічні, функціональні та структурні порушення клітин, тканин та органів, причому навіть на рівні геному. Розвиток та перебіг діабету відбувається на тлі інтенсифікації оксидативного та нітрозативного стресу, модифікації протеїнів, особливо їх глікування, активації сигнальних шляхів, запальних процесів тощо, можливий коригуючий вплив на ці процеси елементів ванадію та хрому сприятиме принаймні частковій нормалізації досліджуваних процесів.

Ґрунтуючись на вищезазначеному, обрана тема дисертаційної роботи та вирішені поставлені в роботі завдання, а також аналіз отриманих результатів проведених досліджень сприятимуть вирішенню актуальної медико-соціальної проблеми щодо профілактики та лікування цукрового діабету 1 типу, а також

доповнить існуючі відомості щодо впливу Ванадію та Хрому отриманих із застосування нанотехнології на метаболічні та функціональні порушення в організмі, що є актуальним як у теоретичному, так і в практичному значенні та дозволить розширити та поглибити розуміння щодо механізмів дії цих мікроелементів та встановити на які саме метаболічні шляхи вони впливають.

Обґрунтованість наукових положень дисертації, їх достовірність і новизна

У відповідності до мети роботи автором обґрунтовано наукові положення дисертаційної роботи та проведено аналіз наукових літературних джерел стосовно стану проблеми лікування цукрового діабету з метою з'ясування на яких аспектах слід зосередити вирішення поставлених у роботі завдань. Сушко О. О. обґрунтувала актуальність та важливість дисертаційної роботи як у теоретичному, так і в практичному аспекті, сформулювала мету та завдання досліджень, для виконання яких нею були використані сучасні спектрофотометричні, хроматографічні, імуноензимні та статистичні методи. Автор зазначила, що отримані результати можуть бути перспективними для їх застосування у профілактиці та лікуванні ЦД та асоційованих з ним ускладнень.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає в тому, що результати проведених досліджень дають змогу доповнити та розширити інформативну базу стосовно впливу цитратів ванадію та хрому, які синтезовані з використанням нанотехнології в залежності від їх дози, на окремі метаболічні процеси в організмі щурів за експериментального цукрового діабету. Вперше показано, що на тлі цукрового діабету цитрат ванадію у дозах 0,125, 0,5 та 2,0 мкг/мл води, та цитрат хрому, у дозах 0,1 і 0,2 мкг/мл води здатні проявляти гіпоглікемічний, антиатерогенний та антиоксидантний вплив. Автором встановлено, що сумісна дія цитратів ванадію (0,5 мкг/мл води) та хрому (0,1 мкг /мл води) призводить до зниження концентрації глюкози та вмісту глікозильованого гемоглобіну в крові на тлі ЦД, а також сприяє підвищенню маси тіла тварин. Встановлено виражену антиоксидантну дію цитратів ванадію та хрому на тлі ЦД свідченням чого є зниження вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у підшлунковій залозі тканинах печінки, нирок, скелетних м'язів а також у плазмі крові тварин. Ст. Виявлено корегуючий дозозалежний вплив досліджуваних мікроелементів на систему антиоксидантного захисту у досліджуваних тканинах щурів та крові на тлі ЦД. Встановлено, що цитрати ванадію та хрому знижували загальний вміст ліпідів та окремих їх представників, а саме: фосfolіпідів, неетерифікованого холестеролу, триацилгліцеролів у крові тварин на тлі ЦД, може пригнічувати розвиток атеросклерозу. Використані у дослідженнях мікроелементи у встановлених дозах можуть знайти застосування в якості допоміжної терапії при лікуванні ЦД та його ускладнень, оскільки володіють гіпоглікемічною дією та позитивно впливають на метаболізм ліпідів.

Наукові положення дисертаційної роботи Сушко О.О. ґрунтуються на достатній кількості отриманих результатів із використанням сучасних методів досліджень. Статистичний аналіз отриманих даних проведено з використанням програмного пакета Microsoft Excel, вірогідними були дані при $P < 0,05$. Автором проаналізовано результати досліджень та сформульовано висновки.

Науково-практична значимість роботи та конкретні шляхи використання результатів досліджень

Результати дисертаційної роботи дають змогу доповнити та розширити сучасні уявлення стосовно можливого використання цитратів ванадію та хрому отриманих з використанням нанотехнології, як окремо у підібраних дозах, так і сумісно із іншими препаратами для профілактики та лікування цукрового діабету та його ускладнень, за яких за звичай існує дефіцит цих мікроелементів. За ЦД цитрати ванадію та хрому як окремо так і за сумісної дії проявляли коригуючий вплив на досліджувані метаболічні процеси та показники. Автор приймала участь у розробці патенту на корисну модель «Спосіб корекції метаболічних процесів в організмі за цукрового діабету», який було отримано. Результати роботи впроваджені у навчальний процес кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка, кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та кафедри лабораторної медицини ВНКЗ ЛОР «Львівська медична академія імені Андрея Крупинського».

Структура роботи

Дисертаційна робота викладена на 198 сторінках друкованого тексту і включає вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, який містить 423 найменувань. Роботу проілюстровано 28 рисунками та 21 таблицями.

Сушко О.О. самостійно здійснила аналіз даних літературних джерел у відповідності до теми роботи, відтворено модель алоксанового цукрового діабету, виконано експериментальну частину роботи, проаналізовано отримані результати та статистично їх опрацювала та оформила дисертаційну роботу. Спільно з науковим керівником розроблено дизайн дисертаційної роботи.

Актуальність досліджуваної теми дисертаційної роботи, її зв'язок з науковими програмами, плановими темами, мета та завдання досліджень, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, апробація результатів роботи, а також публікації за темою дисертації висвітлені у вступі до дисертації.

В огляді літератури розглянуто існуючі сучасні відомості щодо виникнення цукрового діабету 1 та 2 типу їх патогенез та відмінність. Зроблено акцент на ускладненнях ЦД, особливо на серцево-судинних, нефропатії, нейропатії, ретинопатії тощо. Розглянуто механізми, які призводять до надмірного утворення активних форм кисню, що супроводжується розвитком оксидативного стресу та нітрозативного стресу. Автор акцентувала увагу ролі співвідношення вільних NADH/NAD пар, підвищення якого за гіперглікемії супроводжується порушенням регуляторного впливу на ключові метаболічні шляхи, зокрема гліколіз, ланцюг транспорту електронів тощо. Пероксидне окиснення ліпідів, яке активується за оксидативного стресу не залишилось поза увагою автора. Проаналізовано дані

літературних джерел, які свідчать про те, що ряд мікроелементів, зокрема іони Cr (III), Mn (II), Mo (VI), Se (V), V (IV/V), W (VI) та Zn (II) можуть проявляти інсуліноподібний ефект. Більш повно розглянуті дані стосовно властивостей та механізмів дії Ванадію за цукрового діабету у дослідях на тваринах та зазначено що він токсичний у високих дозах. У літогляді висвітлено важливе значення Хрому (Cr, III) у метаболізмі глюкози та ліпідів, а також його здатність зв'язуватися хром-зв'язувальним олігопептидом, який назвали хромодуліном, який охарактеризували за масою, складом амінокислот та здатністю зв'язувати чотири іони Хрому. Зазначено, що солі Cr³⁺, хлорид, піколінат і нікотинат використовуються у дієтичних добавках, особливо для спортсменів, що може також знайти використання для профілактики та лікування ЦД та його ускладнень.

У другому розділі роботи на рис. 2.1 представлена загальна схема проведення досліджень, яка включає три етапи, кожен із яких відображений у схемі. У цьому розділі акцентована увага на використаних у дослідженнях сполуках цитратів ванадію та хрому, які були отримані із застосуванням методу аквананотехнології на базі ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології» (Україна, Київ). Описано отримання плазми крові, лізатів еритроцитів, та гомогенатів тканин для проведення досліджень. Подана інформація стосовно моделювання експериментального цукрового діабету одноразовим внутрішньоочеревинним введенням 5% розчину алоксан моногідрату («Синбіас», Україна, 150 мг/кг маси тіла тварин), стосовно матеріалів та методів досліджень, опис яких є достатнім для оцінки достовірності отриманих даних. Використання цієї експериментальної моделі дозволило автору не тільки відтворити цукровий діабет 1 типу, як відносну інсулінову недостатність, але і провести на ній дослідження щодо виявлення метаболічних та функціональних порушень у досліджуваних органах не тільки за ЦД, але і за введення на його тлі цитратів ванадію та хрому, як окремо так і сумісно у підібраних дозах.

У третьому розділі та в його підрозділах представлені результати щодо впливу цитрату ванадію у дозах 0,125, 0,5 та 2,0 мкг/мл води та цитрату хрому у дозах 0,1 та 0,2 мкг/мл води на концентрацію глюкози у крові, масу тіла та окремих органів щурів, вміст глікозильованого гемоглобіну, показники пероксидного окиснення ліпідів та систему антиоксидантного захисту у тканинах тварин, вміст ліпідів, зокрема фосфоліпідів, неестерифікованого холестеролу, неестерифікованих жирних кислот та триацилгліцеролів у крові та активність ензимів глутатіонової ланки та вміст відновленого глутатіону в еритроцитах крові та досліджуваних тканинах тварин за цукрового діабету. Отримані результати дозволили встановити, що введення цитратів ванадію та хрому, отриманих із використанням нанотехнології, діабетичним тваринам частково або повністю відновлювало досліджувані метаболічні процеси та показники. Варто відмітити, що за сумісного впливу досліджуваних цитратів ванадію та хрому у встановлених дозах 0,5 мкг/мл та 0,1 мкг/мл води відповідно, ефект цих мікроелементів у корекції виявлених метаболічних порушень індукованих ЦД був більш вираженим.

У четвертому розділі роботи «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» автором узагальнено результати, які були отримані підчас виконання

досліджень, а також обґрунтовано основні положення дисертації, що дозволило сформулювати висновки.

Представлена до захисту дисертаційна робота відповідає вимогам до кандидатських дисертацій, а саме: за обсягом проведених досліджень, отриманими результатами та їх новизною як у науковому, так і в практичному значенні, а також за висновками.

Основні результати дисертаційної роботи Сушко О. О. викладені в авторефераті та у 29 наукових працях, з них 12 статей у наукових виданнях (дві – у зарубіжних та дві – у тих, що входять до наукометричної бази Web of Science), 1 патент України на корисну модель та 16 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації.

На мій погляд, при загальній позитивній оцінці виконаної дисертаційної роботи, в плані дискусії до роботи та відповідно до автореферату Сушко О. О. є запитання, зауваження та побажання.

Оскільки атомні маси Ванадію і Хрому дуже близькі, причому вважають, що ванадій є більш токсичним, то чому використані дози ванадію 0,125, 0,5 та 2,0 мкг/мл води значно більші, остання навіть у 10 разів у порівнянні із дозами хрому 0,1 та 0,2 мкг/мл води, а не взяті їх еквімолярні концентрації?

Яка різниця в абсорбції цитратів цих двох мікроелементів та яким чином на рівень їх абсорбції впливає те, що вони отримані із використанням нанотехнології?

Відомо, що в організмі ванадій в основному зустрічається в комплексі із протеїнами, зокрема трансферином, альбуміном та гемоглобіном, які транспортують його до тканин, а введений «нанованадій» яким чином буде надходити до тканин?

На мій погляд, не варто було визначати індекс НОМА-IR для цієї моделі цукрового діабету, оскільки «...індекс інсулінорезистентності зростав в 2,4 рази, однак знижувалась концентрація інсуліну в 1,2 раза.», с.108 дисертації.

Для зручності сприйняття бажано було б вказати концентрацію глюкози в крові досліджуваних тварин в числовому вираженні, с.106 дисертації, а не лише представити рис.3.18, а вже потім писати про зміни у відсотках.

Чи є достатнім використаний термін експериментів при з'ясуванні впливу цитратів ванадію та хрому за цукрового діабету на досліджувані процеси та показники?

Слід було вміст продуктів ПОЛ у тканинах печінки, нирок, скелетних м'язів і підшлункової залози щурів виражати не на мл (ОдЕ/мл), що також стосується ТБК-активних продуктів (нмоль/мл), а на мг протеїну цих тканин, табл. 3.11, с. 95.

Згідно Ваших даних та існуючих у літературних джерелах чи механізм дії досліджуваних мікроелементів, які отримані з використанням нанотехнології за використаної моделі цукрового діабету буде однаковим як за 1 так і за 2 типу?

У роботі зустрічаються деякі помилки при написанні, зокрема ЕДТА, замість ЕДТО, с. 20 та інші.

Вищезазначені мною запитання, зауваження та побажання принципово не впливають на загальну позитивну оцінку представленої до захисту роботи.

Вважаю, що дисертаційна робота Сушко Ольги Олександрівни «Метаболічні процеси в організмі щурів за дії цитратів ванадію та хрому на тлі

експериментального цукрового діабету», в якій представлені нові науково обґрунтовані результати, що вирішують поставлені в роботі завдання, є завершеною науковою працею, яка сприятиме розробці нових анти-діабетичних препаратів з використанням досліджуваних цитратів ванадію та хрому, як окремо, так і сумісно в якості допоміжної терапії як для профілактики так і для лікування цукрового діабету та його ускладнень, що особливо є необхідним для пацієнтів молодого віку.

Висновок

Дисертаційна робота Сушко Ольги Олександрівни відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор Сушко Ольга Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04– біохімія.

Офіційний опонент:

Провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України
Доктор біологічних наук, професор

Т.М. Кучмеровська

