

Голові разової спеціалізованої
вченої ради ДФ 35.051.050
у Львівському національному
університеті імені Івана Франка,
доктору біологічних наук,
професору кафедри фізіології
людини і тварин,
професору Іскрі Р. Я.

ВІДГУК

офіційного опонента

Столяр Оксани Борисівни

на дисертацію Дзидзан Ольги Володимирівни

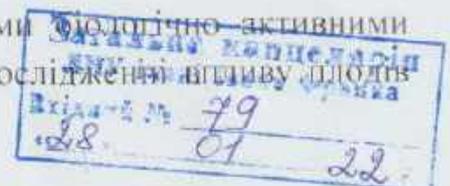
“Антидіабетичний та антиоксидантний ефекти екстрактів плодів дерену справжнього (*Cornus mas L.*) за експериментального цукрового діабету”,
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 “Біологія”

Актуальність обраної теми.

Грунтовний скринінг протидіабетичних засобів, застосованих за останні десятиліття (Jugran et al., 2021) вказує на те, що одним з їх основних потенційних джерел є натуральні продукти рослинного походження. Проте, хоча відомий широкий перелік екстрактів та очищених речовин рослинного походження, які використовуються для лікування діабету, застосування лише окремих з них було науково аргументовано. Тому **обрана тема дисертації**, спрямована на наукове доведення дії потенційних протидіабетичних препаратів рослинного походження шляхом аналізу їх механізмів дії на тваринах, є актуальним науковим завданням.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення.

Наукова новизна результатів визначається, по-перше, тим, що вони доводять наявність іридоїдів і головного з них – логанової кислоти – у плодах дерену, позаяк антидіабетичну дію цих плодів пов'язують з наявністю поліфенолів, а вміст іридоїдів у плодах взагалі вважають незначним. Дисертанткою вперше було доведено, що антидіабетичні властивості саме плодів дерену пов'язані з іридоїдами як головними біологічно активними компонентами. Наукова новизна також полягає у дослідженні впливу плодів



дерену на імунокомпетентні клітини крові за цукрового діабету, оскільки цим клітинам не приділяється увага за дослідження впливу дерену. Вперше було виявлено вплив екстрактів плодів дерену на транспортні системи глюкози у лейкоцитах. Диференційовано біологічну дію екстрактів червоних і жовтих плодів та концентрату логанової кислоти з цих плодів за низкою ознак (антиоксидантною, імуномодулюючою, гіпоглікемічною дією та кінетичними параметрами α -глюкозидази).

Теоретичне значення роботи визначається системним характером дослідження, яке поєднує аналіз хімічного складу плодів, антиоксидантної, імуномодулювальної та гіпоглікемічної дії іридоїдів плодів дерену та їх дії на рівні мембранних і молекулярних мішеней. Саме таке поєднання аналітичної бази з використанням порівняльної характеристики різних джерел екстрактів дало змогу авторці зробити важливі висновки щодо доцільності використання червоних і жовтих плодів та концентрату логанової кислоти у корекції гіперглікемічних станів.

Практичне значення роботи полягає у створенні методологічних засад для розробки нових підходів у корекції гіперглікемії, що ґрунтується на використанні екстрактів плодів дерену. Обрані показники (зниження активності мієлопероксидази лейкоцитів) можуть бути використані як нові біомаркери рівня гіперглікемічної патології. Експериментальні дані, отримані дисертанткою, містять цінну інформацію для використання у навчальному процесі під час підготовки спеціалістів біологічних і медичних спеціальностей.

Зв'язок роботи з державними і галузевими програмами.

Фаховий рівень рецензованої роботи засвідчується її виконанням згідно плану науково-дослідної роботи кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка за темою: "Біохімічні механізми розвитку, діагностики та корекції діабетіндукованого оксидативно-нітративного стресу" упродовж 2017–2019 років (номер держреєстрації 0117U001225); за темою в межах робочого часу викладачів: "Дослідження дії біологічно активних речовин природного походження з метою корекції патологій, що супроводжуються гіперглікемією" упродовж 2020–2021 років (номер державної реєстрації: 0120U101780) та позабюджетної теми в рамках Міжнародного обміну PhD студентів і викладачів, яка фінансувалася польським національним агентством з академічних обмінів (NAWA) у Вроцлавському природничому університеті.

Структура та обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам.

Дисертація побудована згідно вимог щодо структури та пропорцій окремих частин (на огляд літератури припадає 20,4 % обсягу основної частини

дисертації). Дисертацію викладено на 173 с. друкованого тексту, вона містить 25 рисунків та 6 таблиць, а список використаних джерел складає 251 найменування, здебільшого англійською мовою та опублікованих у останні десятиліття, що свідчить про обізнаність із сучасним станом галузі дослідження.

У *вступі* автор наводить слушні аргументи актуальності роботи та коректно визначає мету та відповідні завдання, спрямовані на її реалізацію, об'єкт та предмет дослідження. **Огляд літератури** складається з п'яти підрозділів, що містять сучасну інформацію про біохімічні зміни в організмі за гіперглікемічного стану та практику використання рослинного матеріалу у його корекції. Огляд становить теоретичне підґрунтя для аналізу отриманих результатів і відображає компетентність дисертантки у темі дослідження. Проте, визнаючи ґрунтовність і повноту аналізу літератури щодо розуміння основ дисфункції лейкоцитів і запальних порушень за діабету, все ж зазначаємо, що варто розрізняти специфічні та неспецифічні маркери патології, які дають змогу оцінити загальний стан організму незалежно від етіології захворювання. У підрозділі 1.5 варто було більше уваги приділити досвіду наукової школи кафедри біохімії ЛНУ, адже робота, яка виносить на захист, продовжує серію досліджень, виконаних у колективі та послідовно спрямованих на пошуки коректорів гіперглікемічного стану засобами природного походження – поліфенолами червоного вина, препаратами якону, галеги лікарської, грибів, похідних діамінокислот, тощо.

У роботі використано широкий спектр **методів**, який характеризує високий рівень експериментальної майстерності й ефективність використання співпраці з іншими інституціями. Перелік методів включає клінічні показники, необхідні для оцінки патологічного стану та ефективності його корекції, традиційні біохімічні маркери стану системи антиоксидантного захисту та сучасні методи молекулярно-клітинної біології (флюоресцентно-мікроскопічні, вестерн-блот аналіз, протокова цитометрія, імуноцитохімічний аналіз). Дисертантка застосувала також методи екстракції рослинної сировини та її аналізу із застосуванням ультраефективної рідинної хроматографії у поєднанні з мас-спектрометрією та моделювання впливу екстрактів на ліпіди мембран за їх радикального ураження на моделі ліпосом. В описі застосованих методів (29 підрозділів у розділі 2) дисертантка не уникла типового недоліку – зайвої деталізації з розрахунками для загальновідомих методів лабораторного аналізу (2.10, 2.11, 2.23.1, тощо), причому метод Лоурі лише згадано. Крім того, стосовно методу визначення концентрації глутатіону, використаний неензимний метод оцінює загальний вміст непротеїнових тіолів, тоді як вміст власне глутатіону визначається з використанням глутатіонредуктазного

методу. Для визначення каталазної активності варто використовувати специфічніший метод Аєбі (1984), а не молібдатний. Щодо визначення кінцевих продуктів окисації протеїнів (AOPP), не погоджуємося з формулюванням дисертантки та поширеним твердженням, що ці продукти є наслідком дії хлоровмісних радикалів на протеїни. Реально суміш цих хромофорів, що поглинає за довжини хвилі 340 нм та містить переважно дитирозини, карбонільні групи, дисульфідні, індукується різноманітними радикалами, а не лише хлоровмісними (Taylor et al., 2015).

У **результаті** виконаного дослідження було переконливо доведено, що іридоїди є основними біологічно активними компонентами екстрактів плодів дерену. Дисертантка (підрозділ 3.2) доводить, що екстракти плодів дерену, на відміну від логанової кислоти, мають гіпоглікемічну дію за низкою ознак. При цьому, екстракти обох видів плодів виявилися інгібіторами α -глюкозидази у модельній системі, а інгібування логановою кислотою не виражено (рис. 3.3).

Позитивна дія екстрактів і логанової кислоти була підтверджена у підрозділі за ознаками гематологічних показників крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД, хоча маса тварин з ЦД (рис. 3.5) не нормалізувалася за впливу екстрактів.

Дослідження антиоксидантних властивостей екстрактів червоних і жовтих плодів на моделі мембран ліпосом (підрозділ 3.4) продемонструвало здатність обох екстрактів захищати фосфатидилхолінову мембрану від вільних радикалів. На рівні організму було доведено антиоксидантну дію всіх досліджених екстрактів плодів дерену та логанової кислоти, які зменшували рівень активних форм кисню та продуктів окисного ураження протеїнів і ліпідів, активували ензими антиоксидантного захисту у крові. Найбільш диференційовано вплив екстрактів проявився на рівні кінцевих продуктів глікації та рецепторів до них, експонованих на мембрані лейкоцитів та наявних у плазмі крові щурів (підрозділ 3.5). Особливості поглинання флюоресцентного аналога глюкози лейкоцитами та вміст АТФ у цих клітинах крові за введення екстрактів дерену щурам із цукровим діабетом (підрозділ 3.6) відображають нормалізацію цих показників, причому саме за цими показниками виявилась найбільша ефективність екстракту логанової кислоти. Матеріали цього підрозділу додають важливу інформацію щодо змін стану лейкоцитів за цукрового діабету. Проте, на нашу думку, ґрунтовніший аналіз цих даних вимагає залучення інформації не лише про транспортери глюкози, але й інші відомі факти дисрегуляції вмісту глюкози у плазмі та клітинах крові, зокрема Pezhman et al., 2021 (<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.624184>), Pettersson et al., 2011 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022480>).

У розділі 4 проведено ретельний і послідовний аналіз отриманих результатів порівняно з відомими літературними даними, що засвідчує цілісність створеної картини впливу екстрактів дерену та володіння авторки сучасними науковими даними щодо дослідженої проблеми.

Дисертантка формулює сім висновків, які повністю відображають суть проведених досліджень. Висновки можна було сформулювати лаконічніше і додати констатуючий висновок щодо застосування екстрактів у практиці.

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 та відбору проб, на достатній кількості повторностей у експерименті і одночасному проведенні вимірів у контрольних групах і групах, яка піддавалась дії екстрактів. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже, ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

Недоліки по змісту і оформленню.

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка зауважень щодо інтерпретації даних, стилю та уточнень методичних аспектів.

1. Щодо твердження на с. 90 “Дослідження дало змогу вперше встановити антидіабетичний ефект екстрактів червоних і жовтих плодів” слід уточнити, що власне такий ефект відомий (вплив екстракту плодів дерену на вміст інсуліну та глікованого гемоглобіну у крові хворих з діабетом 2-го типу (Soltani *et al.*, 2015), проте приписувався антоціанам, що містяться у екстракті; плоди дерену зменшували рівень цукру у щурів з діабетом та ожирінням (Carcarova *et al.*, 2019). Відтак, не можна категорично переконувати, що дія екстракту плодів дерену була виявлена вперше. Разом з тим, внесок суміші іридоїдів у що дію було встановлено вперше.

2. Трапляються некоректні вирази, наприклад: “Навіть незначні зміни в організмі позначаються на показниках загального аналізу крові....” (с. 91); “... екстракти плодів дерену ... сприяли приросту маси тіла ...” (с. 95, немає вірогідних змін – рис. 3.5); с. 81 “з УФ-спектром за 246 нм” – мало бути “з максимумом поглинання в УФ спектрі за 246 нм”.

3. Чому для досліду (підрозділ 3.2) під час дослідження кінетики інгібування α -глюкозидази брали у 10 разів більшу концентрацію логанової кислоти, ніж екстрактів?

4. На рис. 3.3 не відображено вірогідні зміни порівняно з контролем.

5. Ключові слова відображають зміст роботи, проте їх перелік занадто деталізований.

Висловлені зауваження і рекомендації не впливають на високу оцінку дисертації О. В. Дзидзан, яка є завершеною науковою роботою. Одержані результати мають вагомое теоретичне значення для розширення знань про молекулярні механізми антидіабетичної дії іридоїдів плодів дерену. Результати репрезентовані на достатній кількості наукових зібрань та у публікаціях високого рівня. Дотримані вимоги ДАК України по оформленню дисертації.

У зв'язку з цим вважаю, що дисертаційне дослідження Дзидзан Ольги Володимирівни "Антидіабетичний та антиоксидантний ефекти екстрактів плодів дерену справжнього (*Cornus mas* L.) за експериментального цукрового діабету" за своїм змістом, рівнем наукової новизни та характером висновків відповідає спеціальності 091 "Біологія" та вимогам постанови Кабінету Міністрів України № 167 від 06.03.2019 р. "Тимчасовий порядок присудження ступеня доктора філософії" (із змінами від 21.10.2020 р. № 979 та від 09.06.2021 р. № 608), не містить ознак порушення академічної доброчесності та оформлене відповідно до вимог, затверджених наказом Міністерства освіти і науки України "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації" від 12.01.2017 р. № 40, тому його автор, О. В. Дзидзан, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 "Біологія".

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри хімії
та методики її навчання
Тернопільського національного
педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка

Оксана СТОЛЯР

