

ВІДГУК**офіційного опонента на дисертаційну роботу****Лабудзинського Дмитра Олеговича на тему «Регуляторний вплив вітаміну D₃ на остеоімунну взаємодію за експериментального цукрового діабету», яка подана до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія**

Актуальність теми. Цукровий діабет характеризується високою смертністю та залишається однією з актуальних медико-соціальних проблем у всіх країнах світу. Як відомо, цукровий діабет характеризується хронічною гіперглікемією, яка є основою розвитку біохімічних та молекулярних порушень в організмі, таких як посилення окисних модифікацій біомакромолекул і розвиток оксидативного стресу (ОС), порушення у функціонуванні цитокінових систем та сигнальних механізмів контролювання клітинних функцій, генералізація прозапальних процесів в організмі тощо. Стійка гіперглікемія призводить до виникнення тяжких ускладнень, серед яких ще недостатньо уваги приділяється вивченню молекулярних механізмів патогенезу вторинного остеопорозу, в основі розвитку якого лежить порушення ремоделювання кісткової тканини.

Структурно-функціональні зміни стану кісткової тканини, як наслідок цукрового діабету, є сьогодні загальноновизнаним фактом. Однак дотепер немає єдиної думки щодо біохімічних механізмів розвитку діабет-обумовлених порушень. Однією з причин може бути зниження ступеня забезпеченості організму вітаміном D₃, що на разі набуло пандемічних проявів серед усіх верств населення. Ключова роль вітаміну D₃ у метаболізмі кальцію, фосфору та процесах ремоделювання кісткової тканини, а також його участь у регулюванні широкого спектру клітинних функцій може бути реалізована лише за умови достатнього рівня в організмі 25ОНD. Тому важливість дослідження змін в обміні та забезпеченості організму вітаміном D₃ і функціонуванні вітамін D-ендокринної системи за експериментального цукрового діабету не викликає сумніву.

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна
Національної академії наук України

1 2 ВЕР 2018

Вх. № 69/03-07

На сьогоднішній день вітамін D₃, як фармакологічний агент, активно застосовується при лікуванні порушень ремоделювання кісткової тканини. Однак дані щодо вибору препарату вітаміну D₃ для проведення терапії досить суперечливі. Тому, особливо перспективними і цікавими є моделювання підходів, що передбачають можливість застосування холекальциферолу у складі супровідної терапії з використанням різноманітних агентів, які чинять комплексний вплив.

Таким чином, актуальність роботи Лабудзинського Д.О. є беззаперечною, беручи до уваги важливість обраної проблеми, яка зосереджена в рамках сучасного наукового напрямку - молекулярна медицина.

Необхідно зазначити, що обраний напрямок є продовженням і розвитком багаторічних наукових розробок з проблеми регуляції обміну й функціонування вітаміну D₃ у нормі й за патологічних станів організму, які традиційно провадились у лабораторії медичної біохімії під керівництвом к.б.н., пров. наук. співр. Апуховської Л.І та д.б.н., професора Великого М.М.

Дисертаційна робота відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки в галузі біохімії людини та тварин і виконувалась згідно плану науково-дослідних робіт лабораторії медичної біохімії та відділу біохімії коензимів і вітамінів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Дисертант особисто проводив експериментальні дослідження, обробку результатів, пошук та опрацювання даних наукової літератури. Аналіз та інтерпретація результатів досліджень проводились спільно з науковим керівником.

Обґрунтованість наукових положень дисертації, їх достовірність та новизна.

Дисертаційна робота присвячена вивченню біохімічних механізмів обміну і реалізації регуляторних ефектів холекальциферолу. В роботі досліджено особливості функціонування вітамін D-пара/ендокринної системи печінки, особливостей метаболізму холекальциферолу та прояву однієї з його найголовніших фізіологічних функцій – остеотропний вплив на

ремоделювання кісткової тканини – і як наслідок один із способів корекції діабет-асоційованих порушень метаболізму у кістковій тканині та остеοімунної взаємодії.

Значний експериментальний матеріал викладено в розділі власних досліджень, у якому послідовно обґрунтовується основне положення роботи, а саме: за експериментального цукрового діабету спостерігається глибокий D-гіповітамінозний стан, який може виникати через зафіксовані порушення експресії компонентів вітамін D-пара/ендокринної системи (зокрема вітамін D₃ 25-гідроксилаз, 25OHD-1- α -гідроксилази, рецепторів гормонально активних форм вітаміну D₃ (VDR), тощо), що обумовлювало порушення балансу мінеральних компонентів й подальший розвиток резорбтивних процесів у кістковій тканині. Особливий інтерес представляють дослідження змін у різних ланках імунної системи, що супроводжували розвиток порушення ремоделювання кісткової тканини за цукрового діабету. Зокрема, виявлено істотний дисбаланс у співвідношенні популяцій регуляторних лімфоцитів – CD4⁺- та CD8⁺-позитивних клітин у крові та селезінці у бік переважання CD4⁺-позитивних клітин. Разом з тим за ЦД спостерігалось посилення гуморальної відповіді В-лімфоцитів на введення тваринам рекомбінантного імуногену субодиниці дифтерійного токсину SB. Оскільки Т- та В-лімфоцити є потужним джерелом експресії компонентів остеокінової системи RANKL/RANK/OPG в організмі, зростання RANKL та OPG у сироватці крові діабетичних тварин та, як наслідок, порушення балансу між компонентами системи, можна розглядати як одну із ключових причин порушення остеοімунної взаємодії за умов ЦД. Отримані дані щодо стану системи RANKL/RANK/OPG за ЦД розкривають молекулярні механізми участі NF- κ B-асоційованих сигнальних шляхів у розвитку індукованих діабетом порушень ремоделювання кісткової тканини.

Продемонстроване в роботі застосування терапевтичних дози вітаміну D₃ за експериментального ЦД переконливо свідчило про покращення біомеханічних параметрів великогомілкової кістки, її мікроархітекtonіки та

мінерального обміну, що відображало нормалізування процесу ремоделювання кістки. Виявлені позитивні ефекти опосередковувалися регуляторною дією холекальциферолу як на експресію ряду функціонально важливих протеїнів у кістковій тканині (OC, VDR), так і на елементи NF-κB-залежного сигнального шляху RANKL/RANK/OPG, який є інтегральним для реалізації osteoimmunної взаємодії. Зокрема важливо, що введення вітаміну D₃ нормалізувало вміст протеїнів сигнального шляху RANKL/RANK/OPG у тканині печінки та у сироватці крові.

У виконанні даної роботи особливо важливим був підбір адекватних методів вирішення поставлених задач, що дозволило отримати достовірні експериментальні результати та обґрунтувати провідні положення роботи.

Зокрема, поєднання біохімічних та імунологічних методів дозволило детально дослідити процеси гідроксилювання холекальциферолу. Показано кореляцію експресії різних форм вітаміну D₃ 25-гідроксилаз у тканині печінки та вмісту продукту реакції - 25OHD у сироватці крові за умов цукрового діабету. Цікавим й доречним виявилось використання гісто-цитологічних і молекулярно-біологічних методів дослідження, оскільки надало можливість наочно продемонструвати діабет-асоційовані морфологічні зміни у печінці, що підтвердилось даними імуноблотингу та якісного ПЛР-аналізу про зміни у експресії регуляторних протеїнів прозапального профілю NF-κB-залежних сигнальних шляхів у тканині печінки. Аналіз матеріалу проведених досліджень дозволяє зробити висновок про достатньо повне теоретичне та експериментальне обґрунтування положень, висунутих в роботі.

Науково-практична значимість роботи та конкретні шляхи використання результатів дослідження. Дисертаційна робота містить нові дані, що стосуються особливостей метаболізму вітаміну D₃ та прояву його функціональної активності за умов експериментального цукрового діабету. У роботі показано, що за ЦД1 існує взаємозв'язок між дефіцитом вітаміна D₃ в організмі та порушеннями NF-κB-залежних регуляторних процесів у кістковій тканині та імунній системі, що обумовлюються змінами експресії

протеїнів остеокінової системи RANKL/RANK/OPG. Продемонстровано, що на фоні діабет-обумовленого дефіциту холекальциферолу спостерігаються істотні зміни у експресії ензимів метаболізму вітаміну D₃ та протеїнів вітамін D-ендокринної системи у печінці. Виявлено коригувальні ефекти терапевтичного введення вітаміну D₃ як на рівень експресії протеїнів D-ендокринної системи, так і на протеїни NF-κB- та RANKL/RANK/OPG-сигнальних шляхів за ЦДІ. Теоретичні положення, сформульовані при аналізі отриманих результатів досліджень, стали основою розширення уявлення про біохімічні особливості розвитку діабет-індукованого остеопорозу і можуть бути використані при подальшому вивченні клітинних процесів за даних умов. Результати проведених досліджень мають важливе значення для медицини, фармакології та токсикології, оскільки розширюють та поглиблюють сучасні уявлення щодо порушень функціонування NF-κB-асоційованих механізмів реалізації osteoімунної взаємодії, системних запальних процесів за експериментального цукрового діабету 1 типу та ролі холекальциферолу в їх коригуванні Ці дослідження можуть слугувати теоретичною та практичною основою для розроблення нових підходів до лікування цукрового діабету, ускладненого патологією кісткової тканини із застосуванням вітаміну D₃ у складі комплексної терапії.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій. Дисертаційна робота викладена на 162 сторінках, ілюстрована 35 рисунками й 7 таблицями, включає традиційно необхідні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їх обговорення, висновки, перелік опублікованих праць за темою дисертації і список використаних джерел (всього 267 посилань), містить 9 додатків. Дисертаційна робота написана грамотно, на високому науковому рівні, із залученням значної кількості оригінальних статей вітчизняних та зарубіжних авторів. Проаналізовані роботи провідних світових фахівців, які працюють в рамках даної проблеми.

Матеріал, викладений в дисертаційній роботі, відповідає меті та задачам досліджень, за змістом дисертація має завершений характер як самостійна науково-дослідна розробка.

Характеризуючи роботу в цілому необхідно відмітити, що дисертант добре володіє теоретичним та фактичним матеріалом, вдало сплановано експериментальне дослідження та підібрано адекватні сучасні методи вирішення поставлених задач. Обробку й статистичний аналіз результатів здійснювали згідно відповідних методів з використанням комп'ютерного забезпечення.

Висновки, зроблені автором, є коректними і логічно узагальнюють проведені експериментальні дослідження. Достовірність висновків підтверджується даними статистичної обробки, наведеними в таблицях та рисунках й не викликають сумнівів.

Зауваження та побажання до дисертації щодо її змісту і оформлення: У структурному й змістовому відношенні дисертація та автореферат відповідають існуючим вимогам атестаційної комісії МОН України до дисертаційних робіт. Суттєвих зауважень до виконаної дисертації немає. Однак після ознайомлення з дисертаційною роботою Д.О. Лабудзинського виявлені окремі недоліки:

- розділи власних досліджень повинні завершуватись більш чітким узагальненням, яке вирізняє новизну даного та перспективи подальших досліджень;
- у дисертації трапляються деякі мовні й технічні невірності: непослідовне дотримання чергування у/в, з/зі/із, і/й/тата інші лексичні помилки; деякі стилістичні та пунктуаційні огріхи. Проте висловлені зауваження та побажання не є концептуальними і не знижують загальної високої оцінки рецензованого дослідження.

Але навіть така довершена праця викликає певні запитання в опонента, що потребують прояснень і уточнень автора.

У порядку дискусії виникли такі запитання:

1. Відповідно до отриманих Вами результатів, яка саме ланка імунітету мала найбільш патогенетично вагомий вплив у формуванні порушень в синтезі компонентів вітаміну D – ендокринної системи печінки ?

2. Поясніть, будь-ласка, детально, в чому саме, на Ваш погляд, полягала цитопротекторна дія вітаміну D₃?

3. Згідно результатів Вашої роботи, що Ви маєте на увазі, рекомендуючи використовувати вітаміну D₃ у супровідній терапії ЦД і в комбінації з якими препаратами Ви би рекомендували його застосовувати ?

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Автореферат дисертації має внутрішню єдність, відображає основний зміст та результати роботи, відповідає сучасним вимогам щодо оформлення.

Зауваження не мають кваліфікаційного характеру, не стосуються суті роботи і тому не впливають на високу позитивну оцінку виконаних досліджень. Їх сучасний рівень, однозначність отриманих результатів і використання адекватних методів математичного аналізу, а також надійна апробація на вітчизняних та міжнародних з'їздах і конференціях, а також сторінках 6 наукових публікацій, у тому числі 4 статей в українських фахових виданнях, 3 з яких входять до науко-метричної бази Scopus, 2 статті в закордонних виданнях та 10 тез доповідей у збірниках міжнародних наукових конференцій свідчить, що **ступінь обґрунтування наукових положень, висновків та рекомендацій, наведених в дисертаційній роботі Д.О. Лабудзинського, є достатньо високим та надійним.**

Рукопис дисертації написано державною мовою з використанням фахової наукової термінології. Стиль викладу матеріалів досліджень, наукових положень, висновків та рекомендацій забезпечує в цілому їх сприйняття. Структура Автореферату повністю відображає зміст дисертації.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Все вищезазначене вказує на те, що дисертаційна робота Д.О.Лабудзинського на тему “Регуляторний вплив вітаміну D₃ на osteoімунну взаємодію за експериментального цукрового діабету”, яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, повністю відповідає спеціальності 03.00.04 – біохімія, є завершеною працею, в якій отримані нові науково-обґрунтовані результати, що у сукупності вирішують одну з конкретних наукових проблем біохімії, спрямовану на дослідження плейотропних ефектів вітаміну D₃ у фокусі порушення ремоделювання кісткової тканини за умов цукрового діабету, що відкриває можливості вирішення практичних задач медицини, пов’язаних із коригуванням діабет-обумовленої резорбції кісткової тканини шляхом регулювання osteoімунної взаємодії.

Наведене вище дозволяє вважати, що дисертаційна робота Лабудзинського Дмитра Олеговича за змістом, обсягом, новизною, практичним значенням одержаних результатів, актуальністю та оформленням повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, галузь знань 091 – біологія, а сам здобувач заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Офіційний опонент

завідувач кафедри ендокринології
Національного медичного університету
ім. О.О. Богомольця
доктор медичних наук, доцент



Підпис
ЗАСВІДЧУЮ Ю.І. Комісаренко
ВИСНИЙ СЕКРЕТАР УНІВЕРСИТЕТУ
09 2010