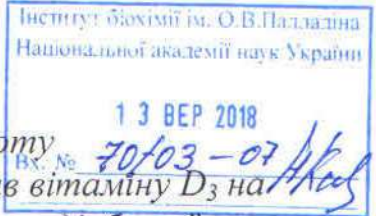


ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Лабудзинського Дмитра Олеговича "Регуляторний вплив вітаміну D₃ на
остеоімунну взаємодію за експериментального цукрового діабету" на
здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія



Актуальність теми

Поширеність захворювання на діабет 1 типу зростає у всьому світі. Інсулінозалежний діабет - група пандемічних виснажливих метаболічних порушень, що характеризуються хронічною гіперглікемією внаслідок недостатності секреції інсуліну. За даними Міжнародної Федерації з Діабету число хворих на діабет в світі складає 7 % населення і до 2030 р. сягатиме вже 435 млн.

Хронічна гіперглікемія, як правило, викликає діабетичні ретинопатію, нефропатію, нейропатію, кардіоміопатію, мікроангіопатію. Крім того, встановлено, що з діабет 1 типу є фактором ризику втрати кісткової тканини в результаті порушення метаболізму, зниження мінеральної щільності кісток, збільшення їх пористості і сприйнятливості до спонтанних переломів внаслідок прискорення резорбції кісткової тканини та/або сповільнення її утворення. Остеопороз як і діабет 1 типу зумовлений порушенням обміну речовин і також є глобальною проблемою охорони здоров'я. За даними ВООЗ остеопороз як причина інвалідності і смертності людини займає четверте місце в світі після серцево-судинних, онкологічних захворювань і цукрового діабету.

На молекулярному рівні посилена резорбція кісток та остеопороз, як правило, є результатом надмірного утворення ліганда рецептора-активатора ядерного фактору каппа-В (RANKL) та інших прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1, IL-6 та IL-17) і медіаторів, що, з одного боку, регулюють диференціювання та функціонування остеобластів, а з іншого, відіграють ключову роль в патогенезі цукрового діабету 1 типу.

Роботи останніх років свідчать про інтенсивну взаємодію між імунною та скелетною системами. Міждисциплінарне поле остеоімунології в даний час

розширюється за рамки кісткових та імунних клітин, визначаючи нові гомеостатичні мережі, в яких інші органи та системи функціонально пов'язані між собою. Тому збереження цілісності скелету може також мати відношення і до інших функцій поза його участю в гомеостазі кісткового мінералу та імунітету.

Важлива роль у формуванні і реабсорбції кісток належить вітаміну D₃ (холекальциферолу) та його прогормонам. Вона полягає не лише в регуляції гомеостазу кальцію, але і у формуванні кісток шляхом сприяння диференціації моноцит-макрофагальних попередників в остеобласти, стимуляції утворення RANKL тощо. Чіткі науково обгрунтовані дані щодо особливостей функціонування механізмів, що беруть участь у реалізації osteoімунної взаємодії та системних прозапальних процесів за умов цукрового діабету 1 типу та експериментально перевірені рекомендації щодо їх раціональної фармакотерапії відсутні. Роль холекальциферолу за цих умов досліджені недостатньо.

Все вище зазначене дозволяє вважати дисертаційну роботу Лабудзинського Дмитра Олеговича, присвячену встановленню патогенезу остеопорозу за експериментального цукрового діабету і механізмів корекції даного захворювання, є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконана згідно з планами наукових досліджень лабораторії медичної біохімії (нині відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України) у відповідності з напрямком науково-дослідних робіт за темою: "Вивчення біохімічних механізмів регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та системних взаємодій за норми та за патології". Розділ теми: "Взаємозв'язок вітамін D₃- та NF-κB-сигнальних шляхів регуляції клітинних функцій у нормі та за патології" (2012-2016 рр., державний реєстраційний номер 0112U002624).

Структура та обсяг дисертації

Повний обсяг дисертаційної роботи – 162 сторінки комп'ютерного друку, та додатків - складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу “Матеріали та методи досліджень”, розділу “Результати досліджень та їх обговорення”, аналізу та узагальненню результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел, який містить 267 джерел латиницею. Дисертація ілюстрована 7 таблицями та 35 рисунками.

Оцінка змісту дисертаційної роботи

В анотації дисертації наведено узагальнений короткий виклад її основного змісту.

У **вступі** здобувач обґрунтував актуальність проведеного дослідження, сформулював мету і завдання роботи, визначив об'єкт і предмет дослідження, аргументовано вказав методи досліджень, показав наукову новизну і практичну значущість отриманих результатів, зазначив свій особистий внесок у виконання дисертаційної роботи, вказав рівень апробації результатів виконаної наукової праці, кількість публікацій за матеріалами дисертації, її структуру і обсяг.

Розділ 1 - Огляд літератури демонструє здатність дисертанта визначитись з головним напрямком досліджень. Він викладений на 27 сторінках і складається з 3-х підрозділів, що містять 9 пунктів, в яких проаналізовано основні механізми розвитку цукрового діабету та його ускладнень, участь імунної системи у регуляції процесів ремоделювання кісткової тканини та особлива увага приділена опису біологічної ролі вітаміну D₃ у процесах остеοімунової взаємодії у нормі та при патології кісткової тканини.

Розділ 2 “Матеріали та методи досліджень” детально розкриває базові етапи експериментальної роботи. Розділ має обсяг 20 сторінок. В ньому дана характеристика лабораторних тварин та умов їх утримання, наведено перелік реактивів та обладнання, детально описано процес моделювання цукрового діабету 1 типу.

Цінним є те, що у даній роботі класичні біохімічні методи, виконані на високому сучасному рівні, підкріплюються дослідженнями з використанням

молекулярно-біологічних, імунологічних, патофізіологічних, біофізичних, морфологічних методів. Такий підхід дозволив оцінити цитокінову систему як ключовий фактор остеοімунітету, визначити роль оксидативного стресу та системи антиоксидантного захисту, проаналізувати мінеральний склад, остеометричні і біомеханічні параметри кістки, рівень експресії мРНК регуляторних білків, провести морфологічні дослідження, тощо. Отримані результати піддані статистичному аналізу.

Загалом, дослідження проведені на достатній кількості лабораторних тварин, і всі маніпуляції виконані у відповідності до Закону України №3447-IV, 2006 “Про захист тварин від жорстокого поводження”, правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою (Страсбург, 1986).

В цілому, матеріали, викладені дисертантом у другому розділі, свідчать про високий рівень методичних підходів, які можна охарактеризувати як сучасні, загально визнані та такі, що відповідають меті та завданням дисертаційного дослідження.

Розділ 3 “Результати досліджень та їх обговорення” викладений на 65 сторінках, має 5 підрозділів і 9 пунктів, ілюстрований 32 рисунками і 7 таблицями, 6 з яких наведені в додатках. Викладення власних результатів досліджень зроблено згідно загальної мети та поставлених завдань.

У **першому підрозділі** наведено біохімічні (вміст глюкози в крові) та морфологічні (гістологічні зміни у підшлунковій залозі) дані, що характеризують розвиток експериментального цукрового діабету 1 типу і підтверджують адекватність відтворення даної моделі. Важливим є встановлення значного зниження вмісту метаболіту вітаміну D₃, 25-гідроксихолекальциферолу в сироватці крові мишей за стрептозотоцинового діабету та здатність уведеного вітаміну D₃ значною мірою нормалізувати гістологічну картину і морфометричні показники стану підшлункової залози та рівень глюкози в крові.

Досліджуючи процес ремоделювання кісткової тканини (підрозділ 3.2), дисертант показав, що за експериментального діабету має місце зниження вмісту кальцію і фосфору в сироватці крові і кістковій тканині, яке корелює зі збільшенням активності лужної фосфатази, що свідчить про наявність значних дистрофічних змін. Підтвердженням цього є виявлення зменшення стійкості кісток до навантаження і їх жорсткості, порушення окостеніння та проліферації хрящових клітин. Методом комп'ютерної томографії виявлено суттєве зменшення відносного об'єму губчастої речовини, тощо.

Автором доведено, що зазначені порушення в кістковій тканині за цукрового діабету, супроводжувались значними змінами вмісту ключових регуляторних протеїнів цитокінової системи - рецептора-активатора фактора транскрипції κB (RANK), його ліганда (RANKL) та остеопротегерину, а також основних регуляторних компонентів внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. При цьому спостерігалась пряма залежність порушень експресії регуляторних протеїнів та маркерів остеогенезу: фактору некрозу пухлин α та тартрат-резистентної кислоти фосфатази в сироватці крові.

Дисертант показав, що порушення ремоделювання кісткової тканини за експериментального цукрового діабету відбувались на тлі значного дефіциту вітаміну D_3 , про що свідчить зниження вмісту його основної циркулюючої форми, метаболіту 25-гідрокси-холекальциферолу, у порівнянні з контролем. Зважаючи на це, актуальними і цілком вірними були дослідження, якими доведено, що повторне уведення вітаміну D_3 в терапевтичних дозах нормалізувало вміст його гормонально активних форм у кістковій тканині, сприяло зменшенню вмісту ліганда рецептор-активатора фактора транскрипції κB і підвищенню рівня його псевдо рецептора-пастки, остеопротегерину, зниженню рівня фактору некрозу пухлин α та тартрат-резистентної кислоти фосфатази в сироватці крові, що суттєво покращувало показники мінерального обміну, структури кісток, процесу ремоделювання кісткової тканини.

У підрозділі 3.3 проведено порівняльні дослідження особливостей функціонування в тканинах печінки мишей ізоформ цитохрому P-450,

залучених до метаболізму холекальциферолу, в нормі, за цукрового діабету 1 типу та за умов уведення на його тлі вітаміну D₃. Аналіз рівня мРНК виявив зростання за діабету експресії основних мікосомальних ізоформ 25-гідроксилази, що, на думку дисертанта, хоча і має компенсаторний характер, проте не забезпечує достатній рівень гормонально активних метаболітів холекальциферолу в організмі.

Встановлено, що повторне введення мишам з експериментальним цукровим діабетом холекальциферолу у терапевтичних дозах практично нормалізувало рівень експресії мРНК досліджених ізоформ CYP450 в печінці за виключенням CYP27B1, хоча вміст його протеїну знизився до величин, аналогічних таким у тварин контрольної групи. При цьому повністю відновився вміст та рівень експресії рецептора вітаміну D₃.

На підставі отриманих результатів дисертант приходить до висновку, що нормалізацію експресії гідроксилаз вітаміну D₃ холекальциферолом за експериментального цукрового діабету можна пояснити регуляцією генів досліджених ізоформ цитохрому P-450 за допомогою рецепторів гормонально активних форм вітаміну D₃.

Підрозділ 3.4 присвячений оцінці впливу вітаміну D₃ на клітинну та гуморальну ланки імунітету за експериментального цукрового діабету. За даними протокової цитофлуориметрії з використанням антитіл проти-CD4⁺ та CD8⁺ Т-лімфоцитів дисертант показав, що за цукрового діабету у периферичній крові та селезінці у порівнянні з контролем зростає співвідношення субпопуляцій CD4⁺/CD8⁺, що може характеризувати стан аутоімунного захворювання. Також завдяки комплексу досліджень, що включають визначення індексу індукованої фітогемаглютинином проліферативної активності в клітинах цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки, вмісту у них фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB, рівня гуморальної відповіді на введення тваринам рекомбінантного імуногену, даними протокової цитофлуориметрії дисертант зокрема довів, що за експериментального діабету значно зростає апоптоз Т-лімфоцитарної популяції селезінки.

При цьому підкреслено, що ключова роль в експресії RANKL як компонента сигнальної системи, що бере участь в регуляції остеокластогенезу, належить імунним механізмам.

На увагу заслуговують дані позитивного впливу вітаміну D₃ як на Т-клітинну ланку імунної системи, так і формування гуморальної відповіді на тлі цукрового діабету.

У підрозділі 3.5 викладені результати досліджень ролі вітаміну D₃ у прооксидантних та прозапальних процесах в печінці за експериментального цукрового діабету.

З використанням конфокальної мікроскопії дисертант показав, що фагоцитарна активність гранулоцитів і моноцитів значною мірою залежить від рівня забезпечення організму вітаміном D₃. Також встановлено, що введення мишам з діабетом вітаміну D₃ сприяло суттєвому попередженню розвитку оксидативного стресу в клітинах печінки за умов хронічної гіперглікемії.

Підвищення рівня активних форм кисню в печінці мишей з цукровим діабетом сприяло активації ядерного фактора κB, порушення регуляції трансдукції сигналів якого викликає надмірне запалення, розвиток аутоімунних реакцій тощо.

На підставі отриманих результатів дисертант приходить до висновку, що в патогенезі виявлених порушень в тканинах печінки за діабету значну роль відіграє дефіцит вітаміну D₃, оскільки введення його мишам за даного стану супроводжувалось значною нормалізацією балансу про-/антиоксидантної систем, рівня експресії прозапальних протеїнів в печінці, покращенню морфологічної картини стану гепатоцитів. Враховуючи обмеженість інформації щодо механізмів розвитку печінкової остеодистрофії, отримані дисертантом дані є суттєвим науковим внеском в розуміння патогенезу даного захворювання.

Аналіз та узагальнення результатів Ознайомлення з цим розділом створює враження цілісності виконаної роботи. Автор володіє знанням сучасної наукової літератури, грамотно аналізує і описує отримані результати, що

дозволило йому систематизувати отриманий матеріал і зробити науково обґрунтовані висновки, які відповідають поставленій меті та завданням дисертаційної роботи.

Список використаних джерел складений у відповідно до існуючих вимог, з чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань. 70 % наведених публікацій датовані останніми 10 роками.

Наукова новизна одержаних результатів

Наукова новизна дисертаційної роботи Д.О. Лабудзинського полягає в тому, що актором вперше проведені комплексні експериментальні дослідження взаємозв'язку між забезпеченістю вітаміном D₃ за цукрового діабету 1 типу і станом цитокінової системи, зокрема цитокінів сімейства фактору некрозу пухлини (NF-κB), що відіграють важливу роль у регуляції метаболізму в кістковій тканині, а також у функціонуванні імунної системи. Дисертант показав, що за експериментального діабету зростає експресія прозапальних цитокінів і регуляторних протеїнів в печінці та сироватці крові тварин, дав комплексну характеристику порушень структурно-функціонального стану кісткової тканини та імунної системи. Довів ключове значення сигнального шляху прозапального фактора NF-κB (p65) у розвитку порушень остеоімунної взаємодії за цукрового діабету.

Встановлено, що дефіцит вітаміну D₃ за цукрового діабету супроводжується порушенням експресії ряду ензимів системи цитохрому P-450, що беруть участь у метаболізмі холекальциферолу та протеїнів D-ендокринної системи. Вважаю, що автором дійсно вперше встановлено, що застосування за цукрового діабету вітаміну D₃ справляє нормалізуючу дію на рівень експресії протеїнів вітамін D-ендокринної системи та протеїни сигнальних шляхів NF-κB (RANKL/RANK/OPG), що відіграють важливу роль у метаболізмі кісткової тканини.

Практична значущість одержаних результатів

Дисертантом проведене комплексне експериментальне дослідження, суть

якого полягає у поглибленні уявлень про механізми, що лежать в основі патогенезу вторинного остеопорозу за цукрового діабету. На підставі біохімічних досліджень із залученням адекватних імунологічних, морфологічних, біофізичних методів доведено зв'язок цитокінової системи RANKL/RANK/OPG з рівнем забезпеченості холекальциферолом на тлі цукрового діабету. Результати дисертаційної роботи дозволили теоретично обґрунтувати доцільність застосування препаратів вітаміну D₃ для профілактики та терапії таких ускладнень цукрового діабету, як вторинний остеопороз.

Результати роботи впроваджено в навчальний і науковий процес кафедри біології Національного університету “Києво-Могилянська Академія”

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота Лабудзинського Дмитра Олеговича “Регуляторний вплив вітаміну D₃ на остеοімунну взаємодію за експериментального цукрового діабету” базується на результатах власних експериментальних досліджень, обсяг яких є достатнім для достовірної аргументації основних положень і висновків дисертації. При проведенні досліджень застосовані сучасні об'єктивні біохімічні, молекулярно-біологічні, імунологічні, фізіологічні, морфологічні, фармакологічні, статистичні методи, що відповідають поставленим завданням. Фактичний матеріал достатньо повно ілюстрований таблицями та рисунками. Тому вважаю наукові положення та висновки дисертації обґрунтованими, узгодженими з метою та задачами дослідження.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Фактичні дані дисертації, а також теоретичні узагальнення повною мірою висвітлені в 6 статтях у наукових фахових виданнях України та інших держав, а також 10 тезах у збірниках наукових праць науково-практичних конференцій, з'їздів, конгресів.

Автореферат за змістом відповідає суті дисертаційної роботи, і в ньому відображені основні її положення.

Зауваження, що стосуються оформлення та змісту дисертації та автореферату

Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. І дисертація, і автореферат написані логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення, хоча і є деякі зауваження непринципового характеру:

- доцільно було б викласти результати власних досліджень окремими розділами, а не підрозділами;
- для встановлення закономірностей взаємозв'язку між рівнем забезпечення організму вітаміном D₃ та окремими показниками osteoімунної взаємодії було б корисним проведення кореляційного аналізу;
- більш коректно говорити про утворення, а не синтез 25-гідроксихолекальциферолу, який є продуктом метаболізму холекальциферолу (висновок 8);
- в тексті часто зустрічаються фрази “терапевтичне введення”, “довготривале введення” замість “уведення в терапевтичних дозах ” та “повторне введення протягом 60 днів”;

Зазначені зауваження не є принциповими і суттєво не впливають на науково-практичну цінність роботи, яка в цілому заслуговує позитивної оцінки.

В рамках дискусії хотілось би почути думку дисертанта з приводу наступних питань:

1. Чим пояснити, що за експериментального цукрового діабету вміст ліганда рецептора активатора фактора транскрипції κВ в тканині великої гомілкової кістки, сироватці крові та печінці у порівнянні з контролем зростає, а рівень його рецептора-пастки, остеопротегерину, в кістковій тканині і паренхімі печінки падає, в той час як в сироватці крові його вміст збільшується?

2. Згідно наведених даних, вітамін D₃ сприяв нормалізації, тобто, зниженню вмісту протеїну CYP27B1, в той час як рівень експресії його мРНК не змінився і залишився такому ж високому рівні, що і за діабету. Ви пояснюєте це зменшенням синтезу ензиму, а чому не посиленням його катаболізму? Чи не вважаєте, що для пояснення даного явища доцільно було б дослідити активність 1 α -гідроксилази, що кодується геном CYP27B1?

3. На Вашу думку, нормалізація остеοімунної взаємодії та ремоделювання кісткової тканини зумовлені прямою дією вітаміну D₃, чи його ефекти опосередковані позитивним впливом на стан прооксидантних та запальних процесів в організмі?

Рекомендації щодо використання результатів дисертації на практиці

Вважаю за доцільне підготовку Інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я стосовно застосування вітаміну D₃ у хворих на діабет 1 типу для попередження розвитку вторинного остеопорозу.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Лабудзинського Дмитра Олеговича "Регуляторний вплив вітаміну D₃ на остеοімунну взаємодію за експериментального цукрового діабету" на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія є закінченим науковим дослідженням. Робота присвячена вирішенню конкретної наукової проблеми – встановленню особливостей функціонування механізмів остеοімунної взаємодії за умов експериментального цукрового діабету 1 типу та обґрунтуванню ефективності вітаміну D₃ щодо її корекції шляхом проведення комплексного дослідження стану сигнальних шляхів, що беруть участь у остеοімунній взаємодії, їх зв'язку з про- та антиоксидантною системами та плеїотропними ефектами холекальциферолу щодо корекції порушень, зумовлених діабетом. За методичним рівнем виконання, актуальністю, обсягом, науковою новизною одержаних результатів, теоретичним і практичним значенням, достатністю і повнотою опублікованого матеріалу, апробацією на наукових форумах різного рівня дисертаційна робота відповідає встановленим вимогам п. 11 «Порядку

присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами згідно Постанови Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2013 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 657 від 27.07.2016 р.), що висуваються до дисертаційних робіт, поданих на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Завідувач відділу токсикології

ДУ «Інститут фармакології та

токсикології НАМН України»

доктор біологічних наук, професор



В.М.Коваленко

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ	
Підпис	<i>проф. Коваленко</i>
Засвідчую	
Учений секретар	<i>Учений секретар</i>
"12" вересня	20 18 р.