

11 БЕР 2019

Вх. № 82/03-07

ВІДЗИВ

офіційного опонента д.б.н. Бондаренко Л.Б. на дисертаційну
роботу Лісаковської Ольги Олександрівни
“ РОЛЬ ВІТАМІНУ D₃ У РЕГУЛЮВАННІ NF-κB-
АСОЦІЙОВАНИХ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ ЗА ПРЕДНІЗОЛОН-
ІНДУКОВАНОГО ОСТЕОПОРОЗУ ”,
подану в спеціалізовану Вчену раду Д 26.240.01
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

1. Актуальність дисертації, її зв'язок з державними та галузевими програмами.

Висока ефективність глюкокортикоїдів у якості протизапальних, антипроліферативних, проапоптотичних та антиангіогенних засобів обумовлює їх широке застосування при лікуванні бронхіальної астми, ревматоїдного артриту, червоного вовчаку, лейкозів, дерматозів. На жаль, одночасно росте і частота метаболічних, гормональних та клінічних порушень, зумовлених їх побічною дією. Серед них одним з найбільш деструктивних є остеопороз, індукований внаслідок довготривалої глюкокортикоїдної терапії. Він є мультифакторним захворюванням, що пов'язане з порушеннями не лише у кістковій тканині, але й у багатьох інших органах та системах. Проте механізми розвитку цієї патології на клітинному та молекулярному рівнях є недостатньо з'ясованими, що перешкоджає ефективному пошуку препаратів для її профілактики та лікування.

Результати наукових досліджень останніх десятиріч дозволяють припустити, що однією з причин розвитку глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу можуть бути порушення у цитокіновій системі рецептора активатора NF-κB (RANK), його

ліганду (RANKL) та остеопротегерину (OPG), що контролює процес остеокластогенезу. Система RANKL/RANK/OPG може бути молекулярною мішенню для дії багатьох регуляторів ремоделювання кісткової тканини.

Серед таких регуляторів одним із найбільш ефективних є вітамін D, що відповідає за узгодженість між процесами формування та резорбції кісткової тканини і, до того ж, D-ауто/паракринна система залучена у множинні регуляторні ефекти – контролю проліферування та диференціювання клітин, імунної відповіді, ангиогенезу та апоптозу.

Складність взаємодій цитокінових сигнальних шляхів та суперечливість інформації щодо впливів на них глюкокортикоїдів та холекальциферолу зумовила актуальність детального вивчення значення дефіциту вітаміну D та порушень синтезу компонентів D-ауто/паракринної системи у органах-мішенях для RANKL/RANK/OPG -сигналювання та експресії транскрипційного фактору NF- κ B.

Обрана Лісаковською О.О. тема кандидатської дисертації, враховуючи все вищезгадане, безсумнівно є актуальною і одержані результати можуть мати велике наукове та практичне значення.

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науководослідних робіт відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та є фрагментом двох НДР: 1) «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (2012-2016 рр., тема № 4, державний реєстраційний номер 0112U002625), розділ теми «Дослідження регуляторної ролі вітаміну D₃ у функціонуванні спеціалізованих клітин в нормі та за патологій, що індукують їх загибель»; 2)

«Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., тема № 15, державний реєстраційний номер 0112U002624), розділ теми «Взаємозв'язок вітамін D₃- та NF-κB-сигнальних шляхів в регуляції клітинних функцій у нормі та за патології».

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

Лісаковською О.О. на належному методичному рівні на моделі *in vivo* із залученням широкого спектру сучасних біохімічних, біомеханічних, гістологічних, імунохімічних, молекулярно-біологічних, методів протокової цитофлуориметрії та конфокальної мікроскопії, а також статистичних методів проведено поглиблене дослідження ролі NF-κB-асоційованого регуляторного сигнального шляху RANKL/RANK/OPG у механізмах розвитку порушень ремоделювання кісткової тканини за експериментального глюкокортикоїд -індукованого остеопорозу та оцінено коригувальний вплив вітаміну D₃. Дисертантом особисто проведений патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури за даною тематикою, на основі яких написано огляд літератури, де детально викладений сучасний стан проблеми, виділено вузлові проблемні питання, обґрунтовано актуальність обраної теми та новизни очікуваних результатів, зроблено логічний перехід до чіткого і конкретного формулювання мети та завдань роботи. Автором самостійно здійснено підбір та опрацювання молекулярно-біологічних та біохімічних методів дослідження, виконано експериментальну частину роботи, статистично проаналізовано, оформлено та узагальнено одержані результати досліджень. Адекватність використаної моделі та методів,

вірогідність одержаних результатів не викликають сумнівів. Висновки, сформульовані Лісаковською О.О. на основі аналізу та статистичної обробки результатів експериментальних досліджень логічно витікають із їх детального обговорення, проведеного автором, і є цілком обґрунтованими.

3. Ступінь новизни наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Вперше Лісаковською О.О. встановлено залежність між дефіцитом вітаміну D в організмі та порушеннями NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у різних тканинах щурів за глюкокортикоїд - індукованого остеопорозу. Вперше продемонстровано зростання кількості RANK-позитивних попередників остеокластів за дії преднізолону у кістковому мозку, периферичній крові та селезінці. У кістковій тканині виявлено глюкокортикоїд -індуковане зменшення співвідношення OPG/RANKL, що є ознакою порушення процесу ремоделювання. Вперше показано здатність вітаміну D₃ частково нормалізувати пул циркулюючих преостеокластів. Вперше продемонстровано участь цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у проявах глюкокортикоїд -індукованої гепатотоксичності. Показано, що вітамін D₃ на тлі дії преднізолону нормалізував вміст RANKL та RANK, зменшував вміст маркерів оксидативно -нітрозативного стресу за рахунок VDR-опосередкованого інгібування NF-κB та підвищення вмісту IκB у печінці.

4. Повнота викладення наукових положень дисертації в опублікованих працях.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових праць, в яких повною мірою відображено її зміст, з них 7 статей як у закордонних, так і у вітчизняних провідних фахових журналах, та 11

тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та вітчизняних наукових конгресів, конференцій та з'їздів.

Опубліковані праці та автореферат повністю відображають одержані здобувачем результати та викладені в дисертації наукові положення.

5. Важливість результатів дослідження для науки і практики, шляхи їх використання.

Практичне значення роботи для медичної біохімії, фармакології, токсикології та медицини обумовлене тим, що отримані у дисертаційній роботі результати значно поглиблюють та розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку вторинного глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та роль NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у патогенезі даного захворювання. Завдяки виявленій здатності вітаміну D₃ модулювати стан сигнального шляху RANKL/RANK/OPG та системи NF-κB/IκB обґрунтована можливість використання холекальциферолу з метою коригування перебігу процесів остеосинтезу та резорбції кісткової тканини за тривалої терапії глюкокортикоїдами.

6. Характеристика дисертаційної роботи.

Дисертація Лісаковської О.О. є цілісною і завершеною науковою роботою, написаною за класичною схемою.

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел (220 найменувань). Дисертацію викладено на 162 сторінках друкованого тексту, загальна кількість ілюстрацій – 6 таблиць та 39 рисунків.

Анотація повно та вичерпно висвітлює основні положення дисертаційної роботи та дає їй адекватне узагальнення.

У вступі чітко та вичерпно висвітлені розділи присвячені актуальності обраної теми, меті і завданням дослідження, науковій новизні результатів, їх практичному значенню, особистому внеску здобувача, апробації роботи.

Огляд літератури написаний логічно, детально, послідовно, містить достатню кількість посилань для ґрунтовного підтвердження висловлювань автора. Очевидним є добре знайомство автора із сучасною зарубіжною літературою, що дає їй можливість на основі проведеного огляду літературних джерел отримати чітке уявлення про стан досліджуваної проблеми на міжнародному науковому рівні.

Розділ, присвячений матеріалам та методам досліджень, містить достатньо детальний опис експериментальних моделей. При описанні окремих методів детально викладений хід їх виконання, наведені принципи використовуваних методів, дані конкретні посилання на описувані методи. Опис застосованих процедур поданий детально, таким чином, що їх можна відтворити.

Розділ 3 присвячений результатам досліджень та їх обговоренню. У підрозділі 3.1 було визначено забезпеченість організму вітаміном D, стан вітамін D-ауто/паракринної системи у різних тканинах щурів, оцінено зміни експресії глюкокортикоїдного рецептору при розвитку глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу, а також досліджено взаємозв'язок дефіциту вітаміну D із функціональними та біохімічними змінами у тканині печінки за хронічного введення преднізолону та їх корекцію вітаміном D₃. Отримані результати показали, що преднізолон викликає виражені зміни у функціонуванні D-ауто/паракринної системи, знижуючи вміст маркера забезпеченості організму вітаміном D – 25OHD і порушуючи експресію її ключових компонентів (VDR та CYP27B1)

у різних тканинах. Автором продемонстровано коригувальний ефект вітаміну D₃ на індуковані преднізолоном порушення експресії VDR та CYP27B1, який був більш виражений у кістковому мозку щурів. Крім того, Лісаковською О.О. виявлено суттєве зменшення вмісту глюкокортикоїдного рецептору GR як у кістковому мозку, так і у тканині печінки щурів за введення преднізолону, що може впливати на сигнальні шляхи із залученням NF-κB. За введення вітаміну D₃ спостерігався різноспрямований ефект на вміст GR – відновлення у кістковому мозку та подальше його зниження у тканині печінки. Отримані Лісаковською О.О. дані також демонструють, що розвиток індукованих тривалим введенням преднізолону клітинно-молекулярних змін у тканині печінки та посилення загибелі гепатоцитів можуть обумовлюватись посиленим ушкодженням протеїнів в результаті розвитку оксидативно-нітрозативного стресу та запальної відповіді.

У підрозділі 3.2 було досліджено коригувальну дію вітаміну D₃ на преднізолон-індуковані порушення мінерального обміну та структурно-функціонального стану кісткової тканини. Отримані результати свідчать про порушення мінерального обміну у сироватці крові та структурно-функціонального стану кісткової тканини за тривалого введення преднізолону. Зниження рівня 25OHD у сироватці крові супроводжується гіпофосфатемією, гіпокальціємією, зростанням активності лужної фосфатази у сироватці крові із одночасним зменшенням вмісту біомаркерів остеосинтезу і мінеральних компонентів у кістковій тканині, що свідчить про розвиток остеопорозу. Позитивний ефект введення вітаміну D₃ на тлі гормональної терапії виявляється у нормалізації мінерального складу сироватки крові та кісткової тканини (частково), а також - у частковому нормалізуванні біомеханічних

параметрів стегнової кістки та повному відновленні вмісту остеокальцину.

У підрозділі 3.3 досліджено дію преднізолону та вітаміну D₃ на компоненти ключового сигнального шляху ремоделювання кісткової тканини RANKL/RANK/OPG. Отримані Лісаковською О.О. дані свідчать, що порушення в цитокіновій системі RANKL/RANK/OPG, які відбуваються на тлі недостатньої забезпеченості організму вітаміном D, можуть відповідати за втрату маси кісткової тканини при тривалому введенні преднізолону. Введення цього гормону індукувало збільшення пулу преостеокластів у кістковому мозку, крові та селезінці, в той час як у кістковій тканині навпаки, спостерігалось зниження кількості зрілих остеокластів. При цьому, відзначено зниження сигналювання через цитокінову систему RANKL/RANK/OPG у печінці, що вказує на відсутність залучення даного сигнального шляху у преднізолон-індуковане активування NF-κB p65 та ушкодження тканини печінки. Натомість, підвищений рівень TNF-α за дії преднізолону, як і підвищене продукування активних форм кисню, може бути індуктором транслокації NF-κB p65 до ядра та пов'язаних з цим негативних ефектів гормону на функціонування печінки. Лісаковською О.О. показано, що вітамін D₃ здатний нормалізувати виявлені порушення ремоделювання кісткової тканини через VDR-опосередкований вплив на клітини кісткової тканини та їх попередників шляхом зміщення остеобласт/остеокластного співвідношення в бік посилення остеосинтезу та нормалізування процесу резорбції. Крім того, вітамін D₃ чинив коригувальний ефект на співвідношення компонентів системи RANKL/RANK/OPG та не впливав на гормон-індукований підвищений рівень TNF-α.

У підрозділі 3.4 було охарактеризовано систему NF-κB у різних тканинах щурів в нормі, за преднізолон-індукованого остеопорозу та при введенні вітаміну D₃. За дії преднізолону виявлено транскрипційне активування каскаду NF-κB за класичним шляхом у клітинах кісткового мозку. Вітамін D₃ інгібував індуковане преднізолоном надмірне активування NF-κB та стимулював NO-індукований апоптоз попередників остеокластів у кістковому мозку, відновлюючи узгодженість між процесами формування та резорбції кісткової тканини. У кістковій тканині Лісаковською О.О. було виявлено преднізолон-індуковане пригнічення активування каскаду NF-κB, що може вести до інгібування процесів остеогенезу/ангіогенезу. Вітамін D₃ відновлював рівень IκB та запобігав фосфорилуванню субодиниці NF-κB p65, здійснюючи коригувальний вплив на порушені NF-κB-асоційовані сигнальні каскади.

У розділі присвяченому аналізу та узагальненню одержаних результатів поданий розширений порівняльний аналіз експериментальних даних. Лісаковська О.О. основну увагу зосередила на дослідженні ролі NF-κB-асоційованого регуляторного сигнального шляху RANKL/RANK/OPG у механізмах розвитку порушень ремоделювання кісткової тканини за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та на оцінці регуляторних ефектів вітаміну D₃ за даної патології. На основі аналізу власних досліджень та даних літератури нею запропоновано детальні схеми реалізації гепатотоксичної дії глюкокортикоїдів, їх впливу на клітини кісткового мозку, на кісткову тканину та коригувальних ефектів вітаміну D₃ на різних рівнях. Таким чином, завдяки широкому спектру та глибині досліджень вперше показано зв'язок між дефіцитом вітаміну D₃ в організмі та тканинно-

специфічними порушеннями NF-κB-залежних сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу. Продемонстровано здатність вітаміну D₃ регулювати вміст компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/IκB. Показано, що введення холекальциферолу відновлювало узгодженість між процесами остеобластогенезу, остеокластогенезу та ангиогенезу. З'ясовано, що зміни експресії компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/IκB при порушенні метаболізму вітаміну D можуть відповідати за втрату маси кісткової тканини при тривалому введенні преднізолону. Вітамін D₃ здатний нормалізувати виявлені порушення ремоделювання кісткової тканини через VDR-опосередкований вплив на клітини кісткової тканини та їх попередники.

Висновки до дисертаційної роботи сформульовані чітко і конкретно, повністю відповідають одержаним результатам, є достатньо обґрунтованими та не викликають заперечень.

Список використаних джерел містить достатню кількість сучасних наукових робіт як вітчизняних, так і зарубіжних авторів.

Таким чином дисертаційна робота Лісаковської О.О. заслуговує позитивної оцінки. Визначена в дисертаційній роботі мета досягнута, а поставлені завдання повністю вирішені. Зміст автореферату висвітлює основні напрямки дослідження та повністю відображує основні положення дисертації та результати дисертаційної роботи.

Однак до дисертації виникають декілька зауважень:

1. Відсутнє обґрунтування припустимості використання саме параметричних критеріїв при статистичному аналізі експериментальних даних.

2. Відсутнє обґрунтування невключення до малюнків та таблиць результатів оцінки статистично вірогідних відмінностей від інтактного контролю.
3. Рисунок 3.28 містить невдалий термін «рази від контролю» без уточнення про який саме контроль йде мова.
4. Видається за доцільне подавати в тексті скорочення термінів однією мовою, або англійською, або українською для полегшення сприйняття інформації.

Крім того, бажано було б з'ясувати у автора наступні питання:

- Якими саме методами проводилась оцінка нормальності розподілу одержаних результатів і гомогенності дисперсій усіх трьох вибірок?
- Чи можуть бути результати, одержані на щурах, що в природі живуть у норах і чий метаболізм вітаміну D є адаптованим до існування в умовах низької освітленості, достатньо адекватно екстрапольовані на людей?
- Чи проводився контроль вмісту вітаміну D у віварійному раціоні тварин та моніторинг рівня споживання кормів тваринами різних експериментальних груп?
- Чи відзначали Ви або інші дослідники прояви нефротоксичності глюкокортикоїдів за даних умов експерименту?
- Чи опубліковані ваші практичні рекомендації стосовно застосування вітаміну D?

Вищезгадані зауваження ніяким чином не зменшують актуальності, наукової новизни, наукового та практичного значення результатів, одержаних Лісаковською О.О. Вірогідність одержаних результатів не викликає сумніву, наведені висновки є

обґрунтованими, актуальність та наукова новизна роботи - очевидні. Одержані результати у повній мірі викладені у опублікованих автором наукових працях.

ВИСНОВОК

У дисертації ЛІСАКОВСЬКОЇ ОЛЬГИ ОЛЕКСАНДРІВНИ **“Роль вітаміну D₃ у регулюванні NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу”** наведено теоретичне узагальнення та вирішення наукової задачі, яка полягає у вивченні ролі NF-κB-асоційованого регуляторного сигнального шляху RANKL (ліганд рецептора активатора ядерного фактора κB)/ RANK (рецептор активатор ядерного фактора κB)/ OPG (остеопротегерин) у механізмах розвитку порушень ремоделювання кісткової тканини за експериментального глюкокортикоїд -індукованого остеопорозу та оцінці коригувального впливу вітаміну D₃ (холекальциферолу).

Дисертація Лісаковської Ольги Олександрівни **“Роль вітаміну D₃ у регулюванні NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу”** є завершеним науковим дослідженням і містить нові науково обґрунтовані положення з біохімії, які раніше не виносились на захист. Із урахуванням актуальності теми, наукової новизни, об’єму проведених досліджень, практичної значущості результатів дисертаційна робота Лісаковської Ольги Олександрівни **“Роль вітаміну D₃ у регулюванні NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу”** відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. із змінами щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а Лісаковська Ольга Олександрівна заслуговує на присудження їй

наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
03.00.04 – біохімія.

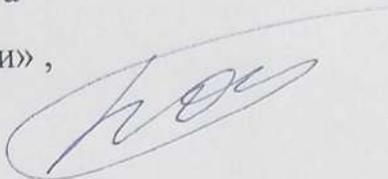
Офіційний опонент –

Головний науковий співробітник

ДУ «Інститут фармакології та

токсикології НАМН України»,

доктор біологічних наук



Л.Б.Бондаренко

Підпис гол. наук. співр., д.б.н. Бондаренко Л.Б. засвідчую

Заст. директора з наукової роботи

доктор хім.наук



Г.С. Григор'єва