

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Тихоненко Тетяни Михайлівни

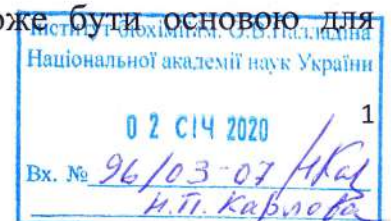
“МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ ДІЇ ВІТАМІНУ В₃ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ”

представленої у спеціалізовану вчену раду Д 26.240.01 Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Актуальність вибраної теми дисертації. Цукровий діабет є одним з найбільш поширених захворювань населення нашої планети, є причиною ранньої інвалідності й летальності. Цукровий діабет супроводжується численними ускладненнями (нейропатія, нефропатія, ретинопатія, кардіоміопатія тощо), біохімічною та клітинно-молекулярною основою яких є оксидативні модифікації біомолекул і розвиток оксидативного стресу, активація поліолового шляху, неензиматичне глікозилювання протеїнів, пригнічення антиоксидантної системи, порушення сигнальних механізмів контролювання клітинних функцій тощо.

На жаль, на сьогоднішній час багато механізмів розвитку ускладнень цукрового діабету не вивчені та відсутні ефективні методи профілактики та лікування багатьох ускладнень захворювання, що зумовлює необхідність досліджень в цьому напрямку.

Вітамін В₃ та його похідні з успіхом застосовують для лікування багатьох нейродегенеративних та психічних захворювань, зокрема епілепсії, шизофренії, хвороби Паркінсона, психозів. Особливо актуальним є питання щодо застосування цього вітаміну в корекції метаболічних порушень при цукровому діабеті. З'ясування механізмів дії вітаміну В₃ та його регуляторного впливу у NAD-залежних процесах за цукрового діабету та його ускладнень, виявлення нових функціональних мішеней дії вітаміну В₃ сприятиме розумінню перебігу цих процесів та може бути основою для



розробки нових методів і засобів для профілактики та лікування даного захворювання. Тому обрану тему дисертаційної роботи слід вважати актуальною.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Робота виконувалась у рамках наукових досліджень відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України у відповідності з напрямком науково-дослідних робіт Інституту за темами: “Дослідження молекулярних механізмів реалізації біологічної ролі вітамінів, коензимів та їхніх протеїнів-акцепторів у забезпеченні функціонування та життєздатності клітин за норми та за умов деяких патологій” (2007-2011 рр., № д.р.0107V003251), «Роль вітамінів А, Е, В1, РР, Д3, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (2012-2016 рр., № д.р. 0112U002625), «Молекулярні механізми залучення вітамінів, їх метаболічно активних похідних і коензимів у функціонування регуляторних систем клітин за норми та патологічних станів» (2017-2021 рр., № д.р. 0117U004345). Роботу було підтримано Премією Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за кращу наукову роботу молодих вчених у 2015 та 2018 роках та грантом для візиту молодих науковців НАН України на стажування в науково-дослідну установу Польської Академії Наук.

Мета і завдання дослідження. Перед дисертанткою була поставлена мета - дослідити молекулярні механізми дії вітаміну В₃ та його біологічно активних похідних за цукрового діабету 1 типу. Завдання роботи сформульовані адекватно та повністю відповідають основній меті дослідження. Всі 5 завдань дисертаційної роботи є коректними та сприяють виясненню молекулярних механізмів впливу вітаміну В₃ та його біологічно активних похідних при цукровому діабеті 1 типу.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором вперше на моделі експериментального діабету 1 типу було проведено комплексне біохімічне

дослідження щодо з'ясування механізмів дії NAm та N-GABA. Виявлено, що NAm та N-GABA проявляють антиоксидантну та протизапальну дію, а останній - також слабку гіпоглікемічну дію. Встановлено, що ці сполуки пригнічуючи активацію поліолового шляху обміну глюкози в мозку, його структурах та у сідничному нерві, також запобігають структурним змінам у цих органах, відновлюючи їх функції. Вперше було продемонстровано, що на тлі цих порушень у мозку діабетичних тварин відбуваються суттєві зміни рівня ключових протеїнів, підтвердженням чого є зниження вмісту нейрональної NO-синтази (n-NOS), фактору росту ендотелійних клітин (VEGF), основного протеїну мієліну (MBP), субодиниць нейрофіламентів легкого (NFL) та важкого (NFH) ланцюгів, у той час як вміст ядерного фактору κB (NF-κB), проапоптичного протеїну BAX, кислого гліального фібрилярного протеїну (GFAP), субодиниці нейрофіламентів середнього ланцюгу (NFM) підвищувався, вміст віментину не змінювався. Було вперше встановлено, що механізми дії NAm та N-GABA реалізуються як через NAD-залежні процеси, так і опосередковано із залученням інших процесів на рівні вмісту протеїнів, оскільки NAm та N-GABA проявляли коригуючий ефект на nNOS, VEGF, NF-κB, BAX, причому NAm мав більш нормалізуючий ефект на вміст NFL, NFH, а N-GABA - на вміст MBP. Також вперше встановлено, що введення N-GABA призводило до підвищення вмісту віментину та GFAP, що може бути результатом проліферації астроцитів як адаптаційно-захисної реакції. Виявлено, що у мозку діабетичних тварин відбувається порушення структурної цілісності його клітин та порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру, доказом чого було підвищення вмісту GFAP та NFL у сироватці крові діабетичних тварин, вміст яких знижувався при застосуванні NAm та N-GABA, що було встановлено вперше.

Практичне значення роботи. Одержані результати мають не тільки фундаментальне значення, поглиблюючи уявлення щодо механізмів дії вітаміну B₃ та його біологічно активних похідних за цукрового діабету, але й

сприятимуть вдосконаленню методів корекції функціональних порушень у тканинах підшлункової залози, мозку, сідничного нерва, нирках, які виникають за цієї патології. Завдяки їх антиоксидантній, протизапальній дії, а також реалізації дії на рівні ключових протеїнів мозку ці сполуки можна рекомендувати для використання в клініці ЦД та його ускладнень. Крім того, результати дослідження сприятимуть пошуку нових методичних підходів для створення нових кон'югованих препаратів на основі вітаміну В₃ та його біологічно активних похідних для корекції виявлених порушень у клітинах, тканинах та органах, індукованих цукровим діабетом.

Результати досліджень використовуються у навчальному процесі та науковій роботі кафедри біоорганічної та біологічної хімії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, а також можуть бути використані у навчальних програмах та науковій роботі інших вищих навчальних закладах біологічного та медичного профілю.

Стосовно **структури та обсягу дисертації** слід відзначити, що вона викладена на 158 сторінках друкованого тексту та проілюстрована 27 рисунками і 7 таблицями, складається з анотації, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів дослідження та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел – 241 посилань. Дисертаційна робота написана на належному науковому рівні, із залученням для обговорення отриманих результатів значної кількості оригінальних статей вітчизняних та зарубіжних авторів. Позитивною рисою роботи є використання також численних сучасних методів досліджень.

Огляд літератури докладний і структурований, автором охарактеризовані патогенетичні механізми залучені до метаболічних, структурних та функціональних порушень за цукрового діабету та його ускладнень, а також проаналізовано можливі механізми дії вітаміну В₃ та його біологічно активних похідних у терапії даного захворювання.

У розділі «Матеріали і методи досліджень» автором описано дизайн дослідження, вказано спосіб моделювання цукрового діабету та наведено використані адекватні моделі *in vitro*, зокрема культивування клітин лінії RIN-m5F, EA.hy926. У роботі використано адекватну клінічним проявам модель цукрового діабету 1 типу, індукованого введенням щурам стрептозотоцину. Для оцінки ряду діабетичних порушень у тварин використані сучасні біохімічні та оптичні (спектрофотометрія, протокова цитометрія, світлова та конфокальна мікроскопія); молекулярно-біологічні (електрофорез, імуноблотинг, імуногістохімія); методи роботи із культурою клітин еукаріот (культивування, оцінка їх функціонального стану), статистичні методи.

При наведенні результатів досліджень у розділі 3 автором проаналізовано вплив NAm та N-GABA на загальні показники розвитку цукрового діабету в тварин, а саме: вміст глюкози в крові щурів, зміни маси тіла, структурно-морфологічний стан підшлункової залози, виживання лейкоцитів периферичної крові. Було показано, що застосування NAm та N-GABA не впливало на зміни маси тіла, N-GABA проявляв незначну гіпоглікемічну дію. NAm, в свою чергу, покращував морфологію підшлункової залози. Досліджувані сполуки підвищували життєздатність лейкоцитів, відновлювали їх перерозподіл, знижували рівень АФК та підвищували мембранний потенціал мітохондрій у цих клітинах. У цьому ж розділі наведені результати досліджень *in vitro*, проведених на культурі β -клітин підшлункової залози RINm5F за їх культивування в умовах високої (100 ммоль/л) концентрації глюкози протягом 24 годин. Було показано, що NAm в концентрації 1 ммоль/л запобігав загибелі клітин в результаті оксидативного стресу, спричиненого надмірною концентрацією глюкози в культуральному середовищі. Автор пов'язує ефект NAm із зменшенням оксидативного стресу та, як наслідок, підвищенням мембранного потенціалу мітохондрій досліджуваних клітин. Зважаючи на те, що висока концентрація

глюкози може бути причиною дисфункції ендотелію, автор оцінила рівень мембранного потенціалу та морфологічний стан культури ендотелійних клітин EA.hy926 за умов культивування при високій концентрації глюкози (30 ммоль/л) та за присутності нікотинамід у концентраціях 0,1 та 1 ммоль/л. Отримані результати показали, що NAm у досліджуваних концентраціях підвищує мембранний потенціал мітохондрій та сприяє збереженню морфології ендотелійних клітин.

У розділі 4 роботи наведені результати досліджень метаболічних та структурних змін у сідничному нерві щурів за діабетичної нейропатії та її корекції досліджуваними сполуками. Автором було показано, що застосування NAm та, меншою мірою, N-GABA пригнічувало активацію поліолового шляху обміну глюкози у сідничному нерві, частково запобігало його структурним змінам, підвищуючи щільність волокон сідничного нерву щурів з індукованим діабетом. Значна увага була приділена впливу досліджуваних сполук на перебіг патогенетичних процесів у мозку тварин з індукованим діабетом. Зокрема показано, що інтенсивність поліолового обміну глюкози відрізняється в різних структурах головного мозку діабетичних тварин, в той же час, виявлено коригувальну дію на показники поліолового шляху обміну глюкози у мозку при застосуванні нікотинамід. Автором також оцінено рівень протеїнів мозку цілої низки факторів, які, тією чи іншою мірою, задіяні у патогенезі діабетичної нейропатії, зокрема ядерного фактору κB, VAX, нейрональної NO-синтази, фактору росту ендотелію судин, кислого гліального фібрилярного протеїну, віментину, нейрофіламентів, основного протеїну мієліну, сіртуїнів, а також рівень кислого гліального фібрилярного протеїну та протеїну нейрофіламентів легкого ланцюгу у сироватці крові, що є показником порушення структурної цілісності клітин мозку та проникності гематоенцефалічного бар'єру. При цьому NAm та N-GABA частково або повністю запобігали цим змінам.

Автором також було продемонстровано, що застосування NAm частково нормалізувало енергетичні процеси у досліджуваній тканині нирок діабетичних щурів та сприяло відновленню мікросудин клубочків і каналців нирок про що свідчить зниження вмісту альбуміну у добовій сечі тварин.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах. Основні результати експериментальних досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, повною мірою висвітлені у 19 публікаціях: з них 8 наукових статей у вітчизняних та закордонних фахових виданнях, затверджених переліком рекомендованих видань, та 11 тезах доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Аналіз основного змісту опублікованих робіт дозволяє зробити висновок, що всі наукові положення і висновки дисертації відображені в опублікованих працях.

Принципових зауважень при рецензуванні роботи не виникло. Мають місце деякі стилістичні неточності, можливе скорочення викладення матеріалу в деяких розділах дисертаційної роботи. Разом з тим пропоную дисертантці на офіційному захисті відповісти на наступні запитання:

1. Як Ви бачите місце вітаміну В₃ та його похідних в лікуванні хворих на цукровий діабет 1 типу?
2. Чи вважаєте Ви, що вітамін В₃ повинен застосуватися для профілактики або лікування ускладнень цукрового діабету та яких саме?
3. Ви провели дослідження на моделі експериментального цукрового діабету 1 типу. Чи вважаєте Ви можливим екстраполювати отримані Вами дані на цукровий діабет 2 типу також?

Однак, наведені зауваження та побажання принципово не впливають на загальну позитивну оцінку представленої до захисту дисертаційної роботи, а також не зменшують її високу наукову і практичну значимість.

Висновок. Дисертаційна робота Тихоненко Тетяни Михайлівни є самостійним, завершеним науковим дослідженням. Зважаючи на

актуальність теми, наукову новизну отриманих даних, практичне значення, об'єм експериментального матеріалу, використані методи дослідження та достовірність зроблених висновків, робота в цілому відповідає вимогам п.п. 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а її автор заслуговує на присвоєння ступеня за спеціальністю 03.00.04 – біохімія за вирішення актуальної наукової задачі – з'ясування механізмів дії вітаміну В₃ та його похідних за умов експериментального цукрового діабету 1 типу.

Завідувач кафедри діабетології
Національної медичної академії
післядипломної освіти П. Л. Шупика
член-кореспондент НАМН України,
заслужений діяч науки і техніки України
доктор медичних наук, професор



Б.М. Маньковський