

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Харченко Віталіни Сергіївни «Роль сфінголіпідів в модуляції фосфоліпази Д-залежного сигналінга інсуліна в старості», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія

Дисертаційна робота Харченко Віталіни Сергіївни виконана у відділі фізіології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна згідно з науковими планами науково-дослідних робіт «Роль ліпідів, які беруть участь у сигнальній трансдукції, в модулюванні процесу старіння», «Роль метаболітів сфінгом'єлінового циклу в розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі старіння» та «Роль сфінгом'єліназ у індукованій лікарськими препаратами резистентності клітин до дії інсуліна та тироксину в умовах передчасного старіння» та є їх фрагментом.

Актуальність теми

Представлена до захисту дисертаційна робота Харченко Віталіни Сергіївни присвячена дослідженню регуляції та функціонального значення активації інсуліном фосфоліпази Д (ФЛД) за змін чутливості клітин- і тканин-мішеней до дії інсуліну в старості.

Згідно даних ВООЗ третє місце за розповсюдженістю у світі після серцево-судинних та онкологічних захворювань займає цукровий діабет (ЦД). Кількість хворих на це захворювання в Україні постійно зростає в зв'язку із забрудненням навколишнього середовища, незначною фізичною активністю, соціальними стресами тощо. Тому актуальною проблемою сьогодення є профілактика та лікування цукрового діабету, як 1-го, так і 2 типу, захворювання, яке супроводжується численними ускладненнями, які нерідко призводять не тільки до інвалідизації, але і до смертності хворих на ЦД. У людей похилого віку виникнення метаболічних захворювань, зокрема цукрового діабету 2 типу, ожиріння та нейродегенеративних, таких як хвороби Альцгеймера та Паркінсона, розсіяний склероз з кожним роком зростає. Досить часто метаболічні захворювання асоційовані із порушеннями сигнальних шляхів інсуліну в клітинах, які залучені до регуляції функцій мітохондрій та процесів, які в них відбуваються, а саме: синтезу ДНК і протеїнів, окисного фосфорильовання, функціонування ланцюгу транспорту електронів тощо. Відомо, що у клітинах-мішенях інсулін активує рецептори і рецепторні тирозинкінази, а також викликає активацію сигнальних молекул, зокрема фосфатидилінозитол-3-кіназу (ФІЗ-кіназа), Akt/протеїнкіназу В (Akt/ПКВ), ARF, протеїнкіназу С (ПКС) тим самим впливаючи на регуляцію метаболізму глюкози. Також виявлено, що в деяких клітинах інсулін викликає активацію фосфоліпази Д, яка відіграє важливу роль в регуляції транспорту мембранних везикул, реорганізації цитоскелету, проліферації клітин тощо. Так на культурі 3T3-L1 показано, що ФЛД приймає участь в індукованому інсуліном поглинанні глюкози цими клітинами за рахунок здатності цього ензиму здійснювати транслокацію транспортерів глюкози (ГЛЮТ) із внутрішньоклітинних депо в плазматичну мембрану. При використанні 1-бутанолу, антагоніста ФЛД, а також нового специфічного інгібітора ФЛД (5-флуоро-2-індол дес-хлорогалопеміда (FIFI)) гальмується стимульована інсуліном транслокація ГЛЮТ в клітинну

мембрану, що пригнічує надходження глюкози в клітини. Не дивлячись на те, що існують поодинокі дослідження щодо активації інсуліном ФЛД в гепатоцитах і синаптосомах кори головного мозку молодих статевозрілих щурів, однак механізми дії гормону, особливо при старінні організму не з'ясовані. Більше того, роль ФЛД в процесах ендо- та екзоцитозу та життєздатності клітин є також дуже важливою. Зважаючи на те, що цей ензим може активуватися інсуліном та приймає участь у реалізації сигналу інсуліну надзвичайно актуальним є з'ясування функціональної ролі ФЛД у клітинах- і тканинах-мішенях, на які діє інсулін, як при старінні організму, так і за умов експериментально-індукованих змін ліпідного обміну клітин- і тканин-мішеней. У людей похилого віку при старінні організму та за розвитку інсулінорезистентності відбуваються також інші метаболічні зміни у клітинах, зокрема підвищується вміст церамідів, одних із самих простих представників сфінголіпідів. Існують дані, що екзогенні цераміди, які ще більшою мірою підвищують їх рівень в клітинах пригнічують активність сигнальних шляхів інсуліну впливаючи на Akt/ПКВ, ПКС, а їх синтетичні аналоги можуть пригнічувати активність ФЛД. На даний час відсутні дані щодо впливу ендогенних церамідів на регуляцію інсуліном ФЛД в інсулінозалежних тканинах, таких як м'язова та печінка, а також в інсулінонезалежних, неокортексі, зокрема. Беручи до уваги вищезазначене, актуальним є з'ясування питання, порушення яких саме метаболічних шляхів призводить до надмірного утворення та накопичення церамідів у клітинах при старінні, що змінює чутливість клітин- та тканин-мішеней до дії гормону, а також яким чином зміни рівня церамідів у тканинах-мішенях дії інсуліну впливають на функціонування ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліну. На даний час всі ці актуальні питання залишаються остаточно нез'ясованими. Разом із цим при лікуванні ЦД важливо досягти компенсації порушень вуглеводного обміну та особливо забезпечення поглинання глюкози клітинами, однак це не завжди вдається. Однією із важливих причин цього може бути саме порушення сигналіngu інсуліну, що може призводити до розвитку інсулінорезистентності.

Грунтуючись на вищезазначеному, обрана тема дисертаційної роботи та проведені дослідження дають змогу розширити розуміння механізмів, які призводять до розвитку та посилюють перебіг цукрового діабету та його ускладнень, що сприятиме вирішенню актуальної медико-соціальної проблеми щодо лікування цього захворювання та розробки нових антидіабетичних препаратів, зокрема специфічних інгібіторів сигнальних шляхів інсуліну, які активуються за ЦД.

Обґрунтованість наукових положень дисертації, їх достовірність і новизна

Наукові положення дисертаційної роботи автором у повній мірі обґрунтовано, а також проведено аналіз результатів існуючих досліджень відповідно до теми роботи базуючись на літературних джерелах. Харченко В.С. обґрунтувала актуальність роботи як у теоретичному, так і в практичному аспекті, сформулювала мету та завдання досліджень, а також використала сучасні спектрофотометричні, хроматографічні, радіоізотопні, методи клітинної біології та статистичні. Автором зазначено, що виконання цієї наукової роботи для профілактики та лікування ЦД та його ускладнень є перспективним.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає у тому, що отримані результати дозволили встановити, що ФЛД-залежна ланка сигнального каскаду

інсуліну є високочутливою до змін вмісту ендogenousних керамідів в клітинах-мішенях. Автором встановлено що за активації ФЛД у клітинах- і тканинах-мішенях, стимульованих інсуліном відбувається посилення поглинання глюкози і синтезу глікогену. Вперше виявлено, що індукована інсуліном ФЛД регулюється ФІЗ-кіназою, Akt/ПКВ, фосфатазою фосфатидної кислоти (ФФК), які залучені до сигнального каскаду інсуліну і за стимуляції клітин-мішеней інсуліном ФЛД активується після ФІЗ-кінази і Akt/ПКВ. Виявлено, що передача сигналу інсуліну через ФЛД-залежну ланку в старості порушується в печінці, діафрагмі і неокортексі та супроводжується пригніченням процесів поглинання і запасання глюкози. Вперше встановлено, що при експериментальному моделюванні підвищення вмісту ендogenousних керамідів у печінці, діафрагмі і неокортексі молодих щурів високожировою дієтою, екзогенними 16:0, С2- та С6-керамідами та індукторами утворення керамідів, протипухлинними препаратами доксорубіцином (ДОХ) і паклітакселом, змінюється активації інсуліном ФЛД і процеси обміну глюкози. Слід зазначити, що використання автором специфічних інгібіторів синтезу сфінголіпідів (СФЛ) і сфінгомієліназ (СФМаз) з метою зниження вмісту ендogenousних керамідів супроводжується відновленням активації інсуліном ФЛД і посиленням процесів обміну глюкози, як в старості, так і при моделюванні порушення чутливості клітин- і тканин-мішеней до інсуліну фармакологічними індукторами утворення керамідів.

Науково-практична значимість роботи та конкретні шляхи використання результатів досліджень

Результати роботи щодо активації ФЛД інсуліном і регуляції цього ензиму ФІЗ-кіназою, Akt/ПКВ і ФФК які залучені до сигнального каскаду гормону, розкривають раніше не досліджені аспекти сигнальної трансдукції інсуліну в клітинах печінки та неокортексі. Дослідження впливу активації інсуліном ФЛД на метаболізм глюкози дозволили розширити існуючі уявлення щодо реалізації сигналу інсуліну, а також з'ясувати функціональне значення індукованої інсуліном ФЛД, що дало змогу знайти нову терапевтичну мішень для пошуку засобів та шляхів подолання проблеми порушення чутливості клітин до дії гормональних стимулів. Отримані автором дані щодо пригнічення ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліну і процесів обміну глюкози в старості поглиблюють уявлення щодо клітинних механізмів розвитку нечутливості клітин-мішеней до дії інсуліну при старінні організму. Оскільки для модуляції вмісту СФЛ специфічними інгібіторами, автором використано лікарські препарати та встановлена оборотність цих процесів, то застосований підхід до відновлення чутливості клітин- і тканин-мішеней до дії інсуліну є перспективним для пошуку нових підходів до запобігання розвитку та вже наявних неминучих вікових змін, які пов'язані із порушенням чутливості до гормональних стимулів.

Структура роботи

Дисертаційна робота викладена на 219 сторінках друкованого тексту і включає вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та обговорення, висновки, перелік використаних джерел, що містить 349 найменувань та 2 додатків. Робота проілюстрована 53 рисунками.

Автором самостійно проаналізовано дані літератури стосовно обраної теми роботи, здійснено експериментальне моделювання підвищеного вмісту ендогенних керамідів у печінці, діафрагмі і неокортексі молодих щурів високожировою дієтою, екзогенними 16:0, С2- та С6-керамідами та індукторами утворення керамідів, протипухлинними препаратами ДОХ і паклітакселом, виконано експериментальну частину роботи, проаналізовано отримані результати, проведено статистичний аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання основних положень та висновків роботи, підготовка результатів до публікації. Спільно з науковим керівником д.б.н, проф. Бабенко Н. О. обрано тему дисертаційної роботи, об'єкт і предмет дослідження і проведена інтерпретація отриманих результатів.

Актуальність досліджуваної теми роботи, її зв'язок з науковими програмами, плановими темами, мета та завдання досліджень, наукова новизна і практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, апробація результатів роботи, а також публікації за темою дисертації висвітлені у вступі до дисертації.

У першому розділі, присвяченому огляду літератури, проаналізовані існуючі відомості щодо структури та функціональної ролі ФЛД у клітинах і тканинах ссавців, а також регуляції ензиму в різних клітинних процесах. Автор зосередила увагу на структурній подібності та різниці трьох лізоформ ФЛД. На основі аналізу першоджерел літератури автор знайшла свою нішу щодо з'ясування ролі ФЛД у сигнальній трансдукції інсуліну та регуляції гормоном процесів метаболізму глюкози, особливостей сигнальної трансдукції інсуліну як у класичних, так і некласичних мішенях гормону. Розглянуто сигнальний каскад інсуліну та передача його сигналу в м'язовій тканині, в клітинах печінки та в центральній нервовій системі. Харченко В.С. проаналізувала дані літературних джерел щодо ролі сфінголіпідів у порушенні сигналіngu інсуліну, а також існуючі дані щодо механізмів патологічного та вікового розвитку порушення чутливості клітин до дії гормональних стимулів та ролі в цих процесах кераміду. Огляд літератури цілком відповідає темі та меті дисертаційної роботи.

У другому розділі роботи надана інформація стосовно постановки та дизайну проведення експериментів, а також описані методи досліджень, зокрема отримання первинної культури гепатоцитів, оцінки впливу різних чинників на активацію інсуліном фосфоліпази Д, дії інгібіторів сигнальних шляхів та індукторів утворення кераміду і інгібіторів обміну сфінголіпідів і сфінгомієліназ на індуковану інсуліном активацію фосфоліпази Д тощо. Для оцінки достовірності отриманих даних, опис всіх методів представлений у достатній мірі. Експерименти проведені на 124 щурах-самцях лінії Вістар 3-х та 24-х місячного віку. Автором здійснено експериментальне моделювання вікових порушень активації ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліну клітин печінки, тканин діафрагми 3-х місячних та гепатоцитів і тканин неокортексу 24-х місячних щурів. Отримані дані проаналізовано методами варіаційної статистики.

У першому підрозділі розділу 3 представлені результати, які свідчать про те, що ФЛД відіграє важливу роль у сигналіngu інсуліну в різних типах клітин- і тканин-мішеней гормону. Продемонстровано, що ФЛД, яка активується після ФІЗ-кінази/Акт/ПКВ, є дуже чутливою до вмісту кераміду як у гепатоцитах, так і в неокортексі. Використання специфічного інгібітора галопеміду, який пригнічує активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози є доказом участі ФЛД у регуляції інсуліном метаболізму глюкози в клітинах печінки та неокортексі щурів. Автором

зазначено, що модуляція активності ФЛД у клітинах за використання специфічних інгібіторів може бути засобом, який дозволить змінювати чутливість гепатоцитів до дії інсуліну.

У другому підрозділі розділу 3 представлені результати, які свідчать про те, що при моделюванні вікових та експериментально індукованих змін регуляції інсуліном фосфоліпази Д у клітинах- і тканинах-мішенях було виявлено, що у старості порушується активація ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліну в клітинах печінки, м'язовій тканині та тканині неокортексу. Автором встановлено, що в діафрагмі, печінці і неокортексі 3-х місячних щурів, яких утримували на дієті з високим вмістом насичених ЖК порушується активації інсуліном ФЛД, як результат підвищення синтезу вільних ЖК та їх похідних ДАГ, ТАГ і цераміду. З'ясовано вплив екзогенних пальмітинової кислоти і С2-цераміду на активацію інсуліном фосфоліпази Д в клітинах- і тканинах-мішенях, що супроводжувалося змінами ліпідного спектру тканин-мішеней інсуліну та особливо підвищенням вмісту цераміду. За моделювання стану резистентності у клітинах печінки молодих щурів пальмітиною кислотою і С2-церамідом та модуляторами накопичення церамідів протипухлинними препаратами такими як, паклітаксел і доксорубіцин, застосування інгібіторів синтезу сфінголіпідів і СФМаз продемонструвало, що новосинтезований церамід здатен пригнічувати ФЛД-залежну ланку сигнального шляху.

У третьому підрозділі 3 розділу проаналізовані отримані результати за умов моделювання вікових (3-х та 24-х місячні щури) змін регуляції інсуліном метаболізму глюкози і стимульованого інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогену у клітинах- і тканинах-мішенях, а саме у клітинах печінки, діафрагмі і неокортексі. Показано, що з віком підвищується вміст церамідів і пригнічується активація ФЛД, що призводить до порушення стимулювання інсуліном метаболізму глюкози. При моделюванні підвищення вмісту цераміду при старінні за використання ендогенних попередників цераміду автором виявлено пригнічення чутливості досліджуваних тканин-мішеней до дії інсуліну. Разом із тим встановлено, що застосування попередників синтезу та індукторів синтезу цераміду відновлює чутливість клітин печінки до дії інсуліну, що підтверджує ключову роль ФЛД у процесі регуляції інсуліном обміну глюкози в клітинах печінки.

В останньому підрозділі 3 розділу представлені результати щодо можливих шляхів корекції чутливості тканин до дії інсуліну, яка знижується з віком. Автором з'ясована дія специфічних інгібіторів ензимів синтезу і деградації цераміду на чутливість клітин печінки та неокортексу до дії інсуліну. Виявлено, що при культивуванні клітин печінки старих тварин та неокортексу при використанні лише одного із інгібіторів синтезу чи деградації сфінголіпідів рівень цераміду знижується і не відновлюється до рівня дорослих щурів, але в залежності від специфічності інгібіторів частково відновлюється чутливість до дії інсуліну ФЛД. За сумісного використання всіх інгібіторів основних шляхів синтезу цераміду може відновлювати чутливість ФЛД-залежного сигнального шляху до дії інсуліну.

У всіх підрозділах 3 розділу автором узагальнено отримані результати проведених досліджень на основі яких сформульовано висновки. У дисертаційній роботі встановлено, що при старінні організму ефективним засобом корекції порушення чутливості клітин до дії гормонального стимулу є модуляція вмісту

церамідів за допомогою інгібіторів обміну сфінголіпідів, які є фармакологічними препаратами.

За обсягом отриманих результатів та їх новизною як у науковому, так і в практичному значенні, представлена до захисту робота відповідає вимогам до кандидатських дисертацій.

Основні результати дисертаційної роботи Харченко Віталіни Сергіївни викладені в авторефераті та у 24 наукових працях, з них 11 статей у наукових фахових виданнях, які затверджені Міністерством освіти і науки України та 13 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових з'їздів і конференцій.

Зміст автореферату є ідентичним до основних положень дисертаційної роботи.

На мій погляд, при загальній позитивній оцінці виконаної роботи, в плані дискусії до дисертаційної роботи та автореферату Харченко Віталіни Сергіївни є ряд запитань, зауважень та побажань.

За якими критеріями було вибрано, моделювання змін активності ФЛД аліментарними факторами, попередниками та індукторами утворення та накопичення ендогенних церамідів, інгібіторів синтезу СФЛ, чому саме їх та яким чином було обґрунтовано використані дози та термін їх дії?

Бажано знати думку автора базуючись на даних літератури, чи існують більш специфічні попередники та модулятори синтезу ендогенних церамідів та інгібітори синтезу СФЛ та чи можна однозначно стверджувати, що дія досліджуваних індукторів та інгібіторів реалізується лише за рахунок їх впливу на досліджувані показники чи може опосередковано за рахунок їх впливу на інші метаболічні процеси та на які саме?

Згідно даних літературних джерел, як можна оцінити внесок ФЛС і ФЛД у сигналінгу інсуліну за фізіологічних умов та при старінні?

При дослідженні модуляції ФЛД-залежного сигналінгу інсуліну чи всі ізоформи ФЛД присутні в досліджуваних тканинах, чи є різниця в інсулінзалежних і інсулін незалежній тканинах?

На стор.5 автореферату вказано, що неокортекс інкубували 90 хв, чи не є цей термін надто тривалим?

Бажано було на рис. 3, 5, 10 та інших автореферату та 3.19 дисертації та інших виражати досліджувані показники не лише в імп за хв на мг білка, а навести реальні величини.

У роботі зустрічаються деякі невдалі вислови, як « зростанні ...клітин мозку та зростання нейронів...», с.63 дисертації та інші.

Варто було дати повну назву доксорубіцину і в авторефераті і в дисертації, а не лише скорочення ДОХ.

Вищезазначені мною зауваження, запитання та побажання принципово не впливають на загальну позитивну оцінку представленої до захисту роботи.

Вважаю, що дисертаційна робота Харченко Віталіни Сергіївни «Роль сфінголіпідів в модуляції фосфоліпаза Д-залежного сигналінга інсуліна в старості», у якій представлені нові науково обґрунтовані результати, що повністю вирішують поставлені в роботі завдання, є завершеною науковою працею, яка сприятиме пошуку нових ефективних засобів корекції порушень чутливості клітин до дії гормонального стимулу шляхом модуляції вмісту церамідів при викортстанні інгібіторів обміну сфінголіпідів як для профілактики так і для лікування при старінні організму, що сприятиме продовженню тривалості повноцінного життя.

Висновок

Дисертаційна робота Харченко Віталіни Сергіївни відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а Харченко Віталіна Сергіївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04– біохімія.

Офіційний опонент:

Провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України
Доктор біологічних наук, професор

Т.М. Кучмеровська

Підпис *Т.М. Кучмеровської*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"02" 01 2019 р.

