

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Харченко Віталіни Сергіївни
«Роль сфінголіпідів в модуляції фосфоліпаза Д-залежного сигналінга
інсуліна в старості», поданої до спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 в
Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна для захисту
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми дисертаційного дослідження.

Старіння супроводжується збільшенням ризиків розвитку різних патологічних станів, зокрема, серцевосудинних, нейродегенеративних захворювань та цукрового діабету (ЦД) 2 типу. ЦД є найбільш поширеним ендокринним захворюванням, розповсюдженість якого в 21 столітті набула характеру пандемії. На сьогодні в світі нараховують близько 415 млн. хворих на ЦД, а за прогнозами Міжнародної Діабетичної Федерації (IDF) їх число до 2045 року сягне 629 млн., тобто діабет буде діагностуватися у кожного десятого мешканця планети.

Одним із наслідків епідемічного характеру даного захворювання є значне підвищення матеріальних витрат, як для пацієнтів, так і для системи охорони здоров'я, які зростають майже вдвічі у порівнянні з особами без ЦД. Серед причин пандемічного зростання ЦД 2 типу, який складає 85–95 % всіх випадків захворювання на ЦД, окрім підвищеної генетичної чутливості певних етнічних груп, також називають фактори навколишнього середовища, малорухливий спосіб життя та надмірне висококалорійне харчування. Всі вищезначені чинники призводять до погіршення чутливості периферичних тканин до дії інсуліну та розвитку інсулінорезистентності, яка є основною патогенетичною ланкою метаболічного синдрому та ЦД 2 типу.

На теперішній час накопичено багато наукових даних які стосуються дослідження молекулярних механізмів передавання сигналу інсуліну в клітинах-мішенях. Проте, залишається ще багато питань, пов'язаних із вивченням залежних від віку станів зниження чутливості клітин до дії гормонального стимулу та механізмів їх розвитку.

Робота Харченко В. С. присвячена вивченню регуляції та функціонального значення окремої маловідомої ланки сигнального шляху інсуліна фосфоліпази Д. Автор дисертації вказує, що фосфоліпаза Д має важливе значення для функціонування клітин, зокрема реалізації процесів клітинного транспорту, але дані щодо активації фермента інсуліном поодинокі. Крім того, в роботі відмічено, що в старості в клітинах відбувається підвищення вмісту таких сигнальних ліпідів як кераміди. Накопичення кераміду пов'язують із розвитком інсулінорезистентності, оскільки він здатен пригнічувати активність низки молекул сигнального шляху інсуліну. Також керамід здатен інгібувати активність фосфоліпази Д.

На теперішній час відсутні дані щодо впливу ендогенних керамідів на регуляцію інсуліном фосфоліпази Д в тканинах-мішенях дії гормону. Залишається також відкритим питання про те, які шляхи утворення керамідів в старості призводять до їх накопичення в клітинах і викликають зниження чутливості клітин- та тканин-мішеней до дії гормонального стимулу. Зважаючи на це, робота Харченко В. С. по дослідженню особливостей зміни вмісту сфінголіпідів в тканинах-мішенях дії інсуліна в старості та їх впливу на вікові порушення функціонування фосфоліпазаД-залежної ланки сигнального каскада інсуліна є актуальною.

Зв'язок роботи з державними та галузевими програмами.

Роботу виконано у відділі фізіології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в рамках науково-дослідної роботи «Роль ліпідів, які беруть участь у сигнальній трансдукції, в модулюванні процесу старіння» (державний номер реєстрації 0109U001577); «Роль метаболітів сфінгом'єлінового циклу в розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі старіння» (державний номер реєстрації 0111U010555); «Роль сфінгом'єліназ у індукованій лікарськими препаратами резистентності клітин до дії інсуліну та тироксину в умовах передчасного старіння» (державний номер реєстрації 0115U000489).

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що автором виявлено порушення в старості передавання сигналу інсуліну через фосфоліпаза Д-залежну ланку в печінці, діафрагмі та неокортексі, яке супроводжується пригніченням процесів поглинання і запасання глюкози.

В роботі встановлено, що експериментально індуковане підвищення вмісту цераміду в клітинах печінки, тканині діафрагми і неокортексі молодих щурів призводить до пригнічення активації інсуліном фосфоліпази Д і процесів поглинання та запасання глюкози.

Зниження вмісту цераміду за допомогою специфічних інгібіторів обміну сфінголіпідів відновлює активацію інсуліном фосфоліпази Д і процесів поглинання глюкози, як в старості, так і при експериментальному порушенні чутливості клітин- і тканин-мішеней до інсуліну. Таким чином, встановлена висока чутливість фосфоліпаза Д-залежної ланки сигнального каскаду інсуліну до змін вмісту ендогенних церамідів в клітинах-мішенях.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що одержані дані щодо активації фосфоліпази Д інсуліном і регуляції цього ферменту висвітлюють новітні аспекти сигнальної трансдукції інсуліну, розширюють класичні уявлення про реалізацію сигналінга гормону, розкривають функціональне значення фосфоліпази Д і обґрунтовують нову терапевтичну мішень для зниження інсулінорезистентності. Отримані результати впроваджено у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна.

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

Робота Харченко В.С. виконана на високому методичному рівні. Достовірність отриманих результатів забезпечується використанням сучасних біохімічних методів, які відповідають меті та задачам роботи, а також адекватними методами статистичної обробки. В роботі використано сучасну біохімічну апаратуру, яка пройшла метрологічний контроль. Результати дисертації цілком переконливі, їх достовірність не викликає сумнівів. Наукові

положення та висновки роботи достатньою мірою узагальнюють сутність отриманих результатів та відповідають на питання, що сформульовані в задачах дослідження, є цілком обґрунтованими та вірогідними

Обсяг і структура дисертації

Дисертація викладена за традиційною схемою на 219 сторінках машинописного тексту та складається зі вступу, 3 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 1 додатку. Обсяг основного тексту дисертації складає 142 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 53 рисунками. Список використаних джерел містить 349 найменувань.

Текст дисертації, як за змістом, так і редакційно викладено та оформлено здобувачем якісно, назва роботи повністю відповідає меті та основному змісту дисертації.

У **вступі** автор обґрунтовує актуальність досліджуваної проблеми, формулює мету, завдання та методи дослідження, визначає наукову новизну і практичне значення отриманих результатів.

Розділ 1 (огляд літератури) написано з урахуванням сучасних наукових даних. Надається детальна інформація стосовно ролі фосфоліпази Д в сигнальних процесах. Висвітлено особливості ефектів інсуліну в різних типах клітин- та тканин-мішеней і регуляції гормоном процесів поглинання та запасання глюкози. Проаналізовано інформацію стосовно регуляції клітинних процесів сфінголіпідами – церамідами.

У **розділі 2 (матеріали та методи дослідження)** наведено опис схем експериментів із загальною характеристикою об'єктів дослідження. Робота базується на результатах експериментів, здійснених на первинній культурі гепатоцитів, тканині діафрагми та неокортексі. Детально описані застосовані методи дослідження: клітинні (ізолювання та інкубування клітин), фізико-хімічні (спектрофотометрія, тонкошарова хроматографія), біохімічні (визначення активності фосфоліпази Д, сфінгомієліназ, визначення вмісту ліпідів, глюкози, глікогена, білка). Вірогідність отриманих результатів та висновків роботи підтверджуються статистичною обробкою.

Розділ 3 (результати та обговорення) містить чотири підрозділи, де описані усі результати даного дослідження, отримані при виконанні поставлених завдань.

Здобувачем було доведено, що інсулін активує фосфатидилхолін-специфічну фосфоліпазу Д у клітинах печінки, м'язовій тканині та неокортексі 3-місячних щурів і цей процес супроводжується посиленням поглинання та запасання глюкози.

Активація інсуліном фосфоліпази Д блокується специфічними інгібіторами фосфатидилінозит-3-кінази та Akt/протеїнкінази В, що вказує на залежність функціонування фосфоліпази від вказаних учасників сигнальної трансдукції гормону. Крім того, регуляція фосфоліпази Д і метаболізму глюкози інсуліном у первинних гепатоцитах молодих щурів є чутливою до антагоніста сигнальних шляхів - цераміда.

В ході експерименту, за допомогою специфічного інгібітора галопеміда, дисертант виявила одночасне пригнічення активації інсуліном фосфоліпази Д і поглинання глюкози, що доводить участь фермента в процесі регуляції гормоном метаболізму глюкози в клітинах печінки та неокортексі щурів.

Встановлено, що у старості відбувається порушення активації фосфоліпаза Д-залежної ланки сигнального каскада інсуліну в клітинах печінки, м'язовій тканині (діафрагмі) і тканині неокортекса. В діафрагмі, печінці та неокортексі 3-місячних щурів дієта з високим вмістом насичених жирних кислот підвищує вміст цераміда та супроводжується порушенням активації інсуліном фосфоліпази Д.

В ході моделювання стану резистентності до дії інсуліну за допомогою екзогенних С2-цераміда і пальмітинової кислоти встановлена зміна ліпідного спектра тканин-мішеней інсуліна – підвищення вмісту цераміда, що супроводжується відсутністю активації фосфоліпази Д. За допомогою інгібіторів обміну сфінголіпідів дисертантом показано, що саме знову синтезований церамід пригнічує фосфоліпаза Д-залежну ланку сигнального шляху інсуліну.

Здобувачем встановлено порушення стимулювання гормоном процесів обміну глюкози, яке пов'язане з віковим підвищенням вмісту кераміду і блокуванням процесу активації фосфоліпази Д. При моделюванні вікового підвищення вмісту кераміда в клітинах печінки, діафрагми і неокортексі щурів за допомогою ендогенних попередників (пальмітинової кислоти і С2-кераміду) встановлено зниження чутливості тканин-мішеней до дії інсуліна. Пригнічення різних шляхів утворення кераміду відновлює чутливість клітин печінки до дії інсуліну при моделюванні стану резистентності. Використання в дослідженні специфічного інгібітора фосфоліпази Д – галопеміда – на тлі підвищення і корекції рівня кераміда за допомогою цитотоксичних препаратів та інгібіторів обміну сфінголіпідів, підтверджує ключову роль фосфоліпази Д в процесі регуляції інсуліном обміну глюкози в клітинах печінки.

Встановлено, що при культивуванні клітин печінки та неокортекса старих тварин в присутності одного з інгібіторів синтеза або деградації сфінголіпідів відбувається зниження рівня кераміду, однак його вміст не відновлюється до рівня дорослих щурів. Зниження вміста кераміду в результаті впливу індивідуальних інгібіторів синтезу сфінголіпідів або СФМазної активності супроводжується лише частковим відновленням чутливості до дії інсуліну фосфоліпази Д. Одночасне пригнічення всіх основних шляхів утворення кераміду за умов одночасного застосування всіх інгібіторів повністю відновлює чутливість фосфоліпаза Д-залежного сигнального шляху до інсуліна у старих щурів.

Автор формулює шість висновків, які загалом відображають сутність отриманих результатів і відповідають поставленим завданням.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях та авторефераті. Автореферат відображає основний зміст дисертації, основні положення якої повністю викладені у 24 надрукованих працях, серед яких 11 статей (4 статті у виданнях, які входять до переліку наукових фахових видань України, 5 статей у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз, 1 стаття у вітчизняному журналі, 1 стаття в електронному

журналі) та 13 тез доповідей в збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних з'їздів і конференцій.

Зауваження що стосуються оформлення та змісту дисертації та автореферату.

Разом із тим, відзначаючи високий науковий та методичний рівень дисертаційної роботи Харченко В. С, доречно зробити деякі зауваження:

1. При моделюванні порушеної чутливості до інсуліну *in vivo* за допомогою висококалорійної дієти та у старих щурів бажано б було підтвердити наявність інсулінорезистентності тестами толерантності до вуглеводів та інсуліну.

2. Весь цифровий матеріал подано у вигляді малюнків при повній відсутності таблиць.

3. На мій погляд, не дуже вдалим є переклад з англійської в назві підрозділу «3. 1. 2 Фосфатидилінозит-3-кіназо- і фосфоліпазо Д-залежна *сигналізація* інсуліна в мозку»

В плані дискусії виникають також наступні питання до здобувача:

1. Чим можна пояснити більш високу активацію інсуліном фосфатидилхолін-специфічної фосфоліпази Д в клітинах неокортекса у порівнянні з клітинами печінки та м'язової тканини щурів 3-місячного віку при однаковому стимулюванні поглинання глюкози і синтезу глікогену в усіх досліджених клітинах?

2. Як Ви вважаєте, вікове підвищення вмісту цераміду в клітинах супроводжується блокуванням лише фосфоінозитол-3 кіназного (метаболічного) шляху інсулінового сигналіngu чи впливає також на мітоген-активованій протеїн-кіназний шлях?

3. Чи можуть досліджені Вами інгібітори метаболізму сфінголіпідів (міріоцин, фумонізін В1, іміпрамін) бути перспективними засобами для зниження інсуліно-резистентності, враховуючи наявність у них широкого спектра побічної дії?

Слід зазначити, що окремі зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційного дослідження.

Висновок про відповідність. Дисертаційна робота Харченко В.С. «Роль сфінголіпідів в модуляції фосфоліпаза Д-залежного сигналінга інсуліну в старості» відповідає паспорту спеціальності 03.00.04 – біохімія. Зважаючи на актуальність і перспективність тематики дисертаційної роботи, наукову новизну отриманих автором результатів, теоретичне і практичне значення, зв'язок із науковими програмами і темами та широке висвітлення результатів у вітчизняній та зарубіжній науковій літературі і їх обговорення на багатьох міжнародних наукових конференціях, з'їздах і симпозиумах, вважаю, що дисертація відповідає вимогам МОН України до кандидатських дисертацій, а її автор Віталіна Сергіївна Харченко заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент,

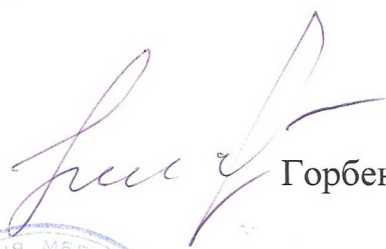
завідувачка лабораторії біохімічних досліджень

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології

ім. В.Я. Данилевського НАМН України»

доктор біологічних наук,

професор



Горбенко Н. І.

