

## **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

**на дисертацію Стороженко Галини Валеріївни**

**«Роль сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння»,  
подану до захисту спеціалізованої вченої ради К 64.051.17  
Харківського національного університету імені  
В.Н.Каразіна МОН України на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 –  
фізіологія людини і тварин**

**Актуальність теми дисертації.** Актуальність теми зумовлена тим, що кардіоліпін (КЛ) – специфічний мітохондріальний ліпід, який зв'язує цитохром С з дихальним ланцюгом та є необхідним компонентом його функціонування; вивчення механізмів розвитку вікових порушень метаболізму кардіоліпіну в функціонально різних тканинах щурів, а також зв'язок цих процесів із функціональною активністю клітин та тканин щурів різного віку є актуальною задачею фізіології. Саме дослідження впливу різних факторів на вміст кардіоліпіну та визначення залежності фізіологічного стану клітин та тканин від його вмісту в процесі онтогенезу може призвести до розробки методів корекції багатьох фізіологічних станів, пов'язаних із порушенням функціонування електронно-транспортного ланцюгу мітохондрій.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дослідження, проведені в дисертаційній роботі, виконані у рамках фрагменту тем планової наукової роботи відділу фізіології онтогенезу Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Роль ліпідів, які беруть участь у сигнальній трансдукції, в модулюванні процесу старіння» (номер державної реєстрації теми 0106U001577), «Роль метаболітів сфінгомієлінового циклу в

розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі старіння» номер державної реєстрації теми 0111U010555), «Роль сфінгомієліназ у віковому порушенні функціонального стану клітин і тканин та у розвитку передчасного старіння організму» (номер державної реєстрації теми 0115U000489).

#### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Авторкою уперше показано, що індукція накопичення ендогенних керамідів і вплив на клітини і тканини, екзогенних керамідів різної природи призводить до зменшення рівня кардіоліпіну і зниження життєздатності клітин. У той час як, інгібітор синтезу кераміду – міріюцин дозволяє знизити індуковану доксорубіцином генерацію керамідів і нормалізувати вміст кардіоліпіну в клітинах молодих щурів.

Уперше показано, що збільшення вмісту кераміду в мозку молодих тварин за допомогою введення C16-кераміду призводить до зниження рівня кардіоліпіну в гіпокампі та сприяє появі депресивно-подібних особливостей поведінки: ангедонії, зменшенню частоти грумінгу та реакцій догляду за собою, зростанню тривожності. Показано також, що вікове зниження рівня кардіоліпіну у тканинах серця, печінки та мозку 24-місячних щурів вдавалось нормалізувати до рівня 3-місячних тварин введенням N-ацетилцистеїну, який пригнічує активність нейтральної сфінгомієлінази. У той же час після внутрішньоназального введення старим щурам N-ацетилцистеїну – препарату, що дозволяє знизити рівень кераміду, також спостерігалось підвищення вмісту кардіоліпіну в мозку, а депресивно-подібні ознаки поведінки зникали.

Доведено також, що додавання екзогенного кардіоліпіну до середовища культивування гепатоцитів, м'язової тканини і кори мозку старих щурів призводило до збільшення базального поглинання ними глюкози і синтезу глікогену та підвищення чутливості цих клітин до дії інсуліну.

**Практичне значення одержаних результатів.** Полягає в тому, що Продemonстровані в даній роботі можливості корекції метаболізму кардіоліпіну за допомогою аліментарних факторів або модуляторів обміну сфінголіпідів можуть являти собою основу для пошуку нових лікарських препаратів і сприяти підвищенню ефективності комплексної терапії вік-асоційованих захворювань. Крім того, фрагменти даної роботи впроваджені в навчальний процес кафедри фізіології людини та тварини біологічного факультету у рамках спеціального курсу: «Клітинні системи сигнальної трансдукції» для студентів 1-го року навчання в магістратурі.

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

Сформульовані Стороженко Г. В. основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації обґрунтовані достатньою кількістю експериментальних даних та їх статистичною обробкою. Використані методи наукових досліджень є сучасними і відповідають вирішенню поставлених мети та задач, базуються на сучасних, адекватних та інформативних методах досліджень. Цифровий матеріал повністю ґрунтується на фактичних даних, які піддавалися математичному аналізу.

**Обсяг і структура дисертації**

Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, висновків та списку використаних літературних джерел, який містить 318 найменувань. Робота викладена на 182 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 4 таблицями та 30 рисунками.

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

У вступі обґрунтовано актуальність проблеми, визначені мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження, сформульовано наукову новизну, та



практичне значення роботи, визначено особистий внесок автора, наведено дані про апробацію отриманих результатів.

**Розділ 1 (огляд літератури).** В огляді літератури, який складається з трьох підрозділів на 20 сторінках викладені сучасні дані про структуру та функціональне значення кардіоліпіну. Представлені дані про особливості метаболізму кардіоліпіну у процесі онтогенезу та проаналізовані відомості щодо змін у структурі та обміні цього ліпиду при різних патологіях. Показано, що зміни метаболізму кардіоліпіну у процесі онтогенезу не до кінця вивчені, оскільки результати отримані різними дослідниками виявились суперечливими та залежали від об'єкту досліджень. Крім того, показана роль сфінголіпідів (зокрема церамиду) в процесі старіння і порушенні функціонального стану клітин і тканин.

В кінці розділу зроблено висновок, та надані публікації щодо результатів дисертації.

**Розділ 2. (матеріали та методи ).** Наведена характеристика об'єкту, схема експерименту та методи дослідження. Методики, які були використані є сучасними, коректними в плані вирішення конкретних завдань. Повнота викладення автором фізіологічних, біохімічних та статистичних методів є цілком достатньою для оцінки обґрунтованості експериментальних досліджень, їх сучасності з точки зору забезпечення якості проведення експериментів та можливості їх відтворення.

Дослідження проводились на білих щурах – самцях 3-, 12-, 24- та 30-32- х місячного віку, а також на вилученої тканині та органах щурів різного віку, та на виділених гепатоцитах і мітохондріях 3- та 24-місячних тварин.

У дисертаційної роботі проводили дослідження вмісту кардіоліпіну в умовах вікового або експериментального накопичення церамідів в клітинах серця, печінки та мозку 3-, 12-, 24- та 30-32-місячних щурів. В експерименті були задіяні інтактні та дослідні тварини у яких накопичення церамідів в клітинах та тканинах досягалося збільшенням калорійності харчового раціону насиченими жирами, або введенням доксорубіцину або

внутрішньошлунковим введенням 40 % етанолу. На другому етапі експерименту збільшення вмісту керамідів досягалося шляхом введення різних доз екзогенних C2-, C16-, або C18-керамідів до клітин та тканин 3-місячних щурів.

Для корекції вмісту кардіоліпіну у представленій роботі використовували експериментальну калорійно-обмежену дієту, або вводили n-3 полі ненасичені жирні кислоти риб'ячого жиру і кверцетин, на тлі дії етанолу.

У третій серії експериментів здобувач досліджував особливості поведінки 3- та 24-місячних щурів у різних поведінкових тестах («Відкрите поле», «Темний/світлий відсік», «Перевага до розчину сахарози», «Годування в незнайомій обстановці», «Імобілізація за хвіст», «Сплеш-тест») при віковому або експериментальному зниженні вмісту кардіоліпіну та збільшенні вмісту кераміду, шляхом внутрішньоназального введення пальмітоїл-кераміду. Для вивчення можливості корекції рівню кардіоліпіну 24-місячним щурам вводили препарати іміпрамін, золедронову кислоту та N-ацетилцистеїн.

Для вивчення ефектів екзогенного кардіоліпіну на фізіологічний стан гепатоцитів, мозку та скелетних м'язів 24-місячних тварин до середи культивування додавали екзогенний кардіоліпін, після чого вивчали інсулін-стимульований транспорт глюкози.

Результати досліджень оброблені сучасними статистичними методами аналізу, є адекватними поставленим задачам.

**В розділі 3 (результати та обговорення)** Дисертантом представлені результати власних досліджень, які склалися з чотирьох етапів.

Здобувачем було доведено зниження рівня кардіоліпіну в серці, печінці та мозку щурів при старінні або при експериментальному накопиченні кераміду в клітинах. Встановлено зниження вмісту кардіоліпіну в м'язовій тканині серця 3-місячних щурів після перфузії цього органу C16-керамідом та в гепатоцитах молодих щурів при культивуванні клітин у присутності

екзогенних С2-, С16-, С18-церамідів, або препаратів які індукують накопичення цераміду – пальмітинової кислоти та доксорубіцину. В той же час інгібітор серинпальмітоїлтрансферази – міріоцин, попереджуючий накопичення цераміду, нівелював ефекти доксорубіцину на гепатоцити, знижуючи рівень цераміду та нормалізував вміст кардіоліпіну в клітинах молодих щурів.

В ході експерименту дисертант виявила, що зменшення вмісту кардіоліпіну в гіпокампі 3-місячних щурів, викликане введенням С16-цераміду, супроводжувалось появою депресивно-подібних розладів поведінки щурів, подібних до спостережуваних у щурів старечого віку: зростанням тривожності, пригніченням локомоторної та дослідницької активності, ослаблення інстинктів догляду за собою.

У ході дослідження впливу інгібітору нейтральної сфінгомієлінази – N-ацетилцистеїну, було виявлено що, знижений рівень кардіоліпіну в печінці, серці та мозку експериментальних тварин 24-місячного віку, відновлювався до такого в тканинах 3-місячних щурів та призводив до корекції порушень у поведінці щурів.

Здобувачем Стороженко Г. В. було доведено, що внесення екзогенного кардіоліпіну до середовища інкубації клітин печінки, кори мозку або литкового м'язу 24-місячних щурів, або гепатоцитів 3-місячних щурів, попередньо інкубованих з доксорубіцином або С16-церамідом, підвищує чутливість цих клітин до дії інсуліну: збільшує базальне та гормон-стимульоване поглинання ними глюкози і синтез глікогену. Цей факт здобувач, пояснює, як відновлення фізіологічного стану клітин та тканин старих тварин.

Аналіз та узагальнення результатів викладено відповідно до послідовності завдань роботи та розділів власних досліджень. Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями в цій галузі. Вони викладені логічно, що свідчить про досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи.



З огляду на прорецензований матеріал можна зазначити, що мета дисертаційної роботи досягнута, а завдання досліджень виконано повною мірою. Отже, дисертаційну роботу можна вважати завершеною. Робота виконана на сучасному науково-методичному рівні і заслуговує позитивної оцінки.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях та авторефераті.** За результатами досліджень, наведених в дисертаційній роботі, опубліковано 24 наукових праці, з яких: 8 статей (2 статті у виданнях, які входять до переліку наукових фахових видань України, 3 статті у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз, 3 статті, які додатково відображають зміст дисертації) та 16 тез доповідей в збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних з'їздів і конференцій. Опубліковані роботи відповідають вимогам щодо результатів дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Автореферат має всі необхідні розділи та за змістом повністю відповідає основним положенням і висновкам, наведеним у дисертації.

**Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.**

Дисертація та автореферат здобувача викладені українською мовою з дотриманням наукового стилю. Їх оформлення в цілому відповідає сучасним вимогам МОН України, щодо викладання, об'єму, структури, посилань на джерела літератури. Є деякі помилки, перелік яких передано авторці. Також є деякі зауваження та запитання.

**Зауваження:**

Основним недоліком вважаю недостатньо підкреслене практичне значення отриманих даних: наприклад, отримані результати щодо корекції пошкоджень, викликаних доксорубіцином – широко вживаним цитостатиком, належать до дуже важливих результатів, які б потрібно було патентувати.

**Запитання:**

Що таке ізоформи кардіоліпіну (стор.33)?

Поясніть будь ласка зв'язок між синтезом кардіоліпіну і керамідів, вплив на ці процеси сфінгомієлінази.

Як Ви визначали інтенсивність синтезу глікогену?

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Дисертаційна робота Стороженко Галини Валеріївни «Роль сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння», є самостійною, завершеною науково-дослідною працею, що містить фундаментальні дані про особливості метаболізму кардіоліпіну у експериментальних тварин різного віку та залежність функціонального стану клітин та тканин від вмісту цього ліпиду.

Таким чином, дисертація за своєю актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, теоретичною і практичною цінністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів затвердженого постановою КМУ № 567 від 24 липня 2013р.

**Офіційний опонент:**

професор кафедри хімії

Національного технічного університету

«Дніпровська політехніка» МОЗ України

доктор біологічних наук, професор

Штеменко Н. І.

