

ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, доцента кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ

України, доцента Горбач Тетяни Вікторівни

на дисертаційну роботу

СТОРОЖЕНКО ГАЛИНИ ВАЛЕРІЇВНИ

«РОЛЬ СФІНГОЛІПІДІВ У ПОРУШЕННІ ОБМІНУ

КАРДІОЛІПІНУ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КЛІТИН І

ТКАНИН У ПРОЦЕСІ СТАРІННЯ»,

представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду 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»

1. Актуальність теми дисертації.

Незважаючи на довголіття проблеми "фізіологія старіння", багато її аспектів залишаються не вивченими. Більш того, чим глибше ми вивчаємо проблему, тим більше виникає питань. Одне з абсолютно не вивчених питань - причини і механізми зміни ліпідного складу мембран мітохондрій при старінні. В даний час відомо, що з віком у клітинах і тканинах тварин відбуваються зміни метаболізму різних груп ліпідів. Одними з таких ліпідів є сфінголіпіди, вікові порушення метаболізму яких асоціюються з виникненням і розвитком цілого ряду патологічних станів: жирової дистрофії печінки, інсулін резистентності, різних нефропатій, атеросклерозу, синдрому Альцгеймера та інших захворювань. Сфінголіпіди є важливими структуроутворюючими ліпідами біологічних мембран, та попередниками активних метаболітів, які грають роль медіаторів клітинних сигналів у процесах проліферації, диференціації та росту клітин, запалення, онкогенезу і старіння. Критична роль у регуляції клітинних процесів через сигнальний сфінгомієліновий шлях належить саме кераміду, який будучи вторинним месенджером, модулює фосфорилування різних білків і є індуктором

апоптозу. Відомо, що рівень цераміду в клітинах істотно зростає в умовах природного старіння організму. Передбачається, що церамід може безпосередньо впливати на мітохондрії, але питання про шляхи, якими накопичення цераміду може призводити до порушення роботи мітохондрій лишається відкритим. Відомо також, що кардіоліпін – специфічний ліпід мітохондрій, який відіграє важливу роль у функціонуванні дихального ланцюга в клітинах, зв'язуючи цитохром C, 3 і 4 комплекси респіраторного ланцюга. Показано, що зниження інтенсивності електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, як правило, пов'язане зі зменшенням вмісту кардіоліпіну. Падіння рівня цього фосфоліпиду спостерігається при ішемії/реперфузії, гіпотиреозі, окисному стресі, серцевої недостатності і може бути однією з ключових причин входження клітини в апоптоз, в той час як підтримка нормального рівня кардіоліпіну надає антиапоптогенні ефекти. У зв'язку з вищесказаним не викликає сумніву можливість залежності функціонального стану мітохондрій від співвідношення церамід / кардіоліпін. В той же час немає даних щодо участі накопичення цераміду із віком у порушенні метаболізму кардіоліпіну. Встановлення взаємозв'язку між вмістом кардіоліпіну, цераміду і функціональним станом клітин та тканин необхідно не лише для розуміння механізмів старіння, а й для розробки методів профілактики та лікування нейродегенеративних захворювань. Таким чином, обрана тема дисертації є актуальною і новою.

2. Зв'язок теми дисертаційної роботи з державними чи галузевими науковими програмами.

Представлена робота є частиною науково-дослідної роботи відділу фізіології онтогенезу Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна у рамках держбюджетних наукових тем: «Роль ліпідів, які беруть участь у сигнальній трансдукції, в модулюванні процесу старіння» (№ державної реєстрації: 0106U001577, здобувач – виконавець), «Роль метаболітів сфінгомієлінового циклу в розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі

старіння» (№ державної реєстрації: 0111U010555, здобувач – виконавець), «Роль сфінгомієліназ у віковому порушенні функціонального стану клітин і тканин та у розвитку передчасного старіння організму» (№ державної реєстрації: 0115U000489, здобувач – виконавець).

3. Новизна дослідження та одержаних результатів

У дисертаційній роботі представлено результати комплексних досліджень щодо ролі сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння.

Автором роботи встановлено значне зниження рівня мітохондріального фосфоліпиду кардіоліпіну в серці, печінці та мозку 30-32-місячних щурів лінії Вістар.

Автором вперше доведено, 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.

Автором отримані нові данні, які свідчать що порушення обміну сфінго- і гліцероліпідів, що викликані етанолом, вдається коригувати додаванням до харчового раціону кверцетину або поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру на тлі дії етанолу.

Отримані нові данні, які свідчать що модуляція обміну сфінголіпідів калорійним обмеженням раціону або дією інгібіторів різних ферментів, які каталізують утворення кераміду, дозволяє нормалізувати знижений рівень кардіоліпіну в клітинах і тканинах старих тварин.

Вперш 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.

Вперше встановлено, що вікове зниження рівня кардіоліпіну у тканинах серця, печінки та мозку 24-місячних щурів нормалізується до рівня 3-місячних тварин введенням N-ацетилцистеїну, який пригнічує активність нейтральної сфінгомієлінази. У той же час після внутрішньоназального введення старим щурам N-ацетилцистеїну також спостерігалось підвищення вмісту кардіоліпіну в мозку, а депресивно-подібні ознаки поведінки зникали.

Автором отримані нові данні про те, що додавання екзогенного кардіоліпіну до середовища культивування гепатоцитів, м'язової тканини і кори мозку старих щурів призводить до збільшення базального поглинання ними глюкози і синтезу глікогену та підвищення чутливості цих клітин до дії інсуліну. В той же час сполучена дія доксорубіцину або C16-цераміду та кардіоліпіну на гепатоцити 3-місячних щурів викликає відновлення функціонального стану клітин, зростання базального та інсулін-стимульованого поглинання глюкози і синтезу глікогену.

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

Дисертаційна робота Стороженко Г.В. виконана на достатній кількості матеріалу. Проведено фундаментальне дослідження, у якому за допомогою сучасних фізіологічних та біохімічних методів дослідження встановлена роль сфінголіпідів у порушенні функціонального стану мітохондрій, клітин і тканин щурів. З ціллю досягнення високого ступеня обґрунтованості положень та висновків проведена всебічна оцінка наявності взаємозв'язку між рівнем цераміду та кардіоліпіну та впливу сфінголіпідів на функціональний стан клітин, тканин, мітохондрій а саме:

- 1) у роботі вивчені вікові особливості вмісту кардіоліпіну в функціонально різних тканинах і органах щурів різного віку;
- 2) проведено вивчення впливу дієтичних факторів та фармакологічних препаратів, що індукують накопичення церамідів або пригнічують їх синтез у клітинах, на вміст кардіоліпіну в тканинах щурів різного віку;

3) встановлена можливість модуляції метаболізму кардіоліпіну за допомогою екзогенних натуральних і синтетичних керамідів у серці, ізолюваних гепатоцитах та мозку 3-місячних щурів.

4) вивчено вплив інгібіторів обміну сфінголіпідів на вміст кардіоліпіну в тканинах і клітинах та поведінку 24-місячних та 3-місячних щурів;

5) шляхом введення екзогенного кардіоліпіну до ізолюваних гепатоцитів, м'язової тканини і кори мозку 24-місячних щурів та ізолюваних гепатоцитів 3-місячних щурів, попередньо інкубованих з C-16 керамідом, з наступним вивченням базального та інсулін-стимульованого поглинення клітинами міченої глюкози та рівня синтезу глікогену встановлено залежність функціонального стану клітин і тканин від вмісту кардіоліпіну ;

6) продемонстровані можливості корекції метаболізму кардіоліпіну за допомогою аліментарних факторів або модуляторів обміну сфінголіпідів.

Статистична обробка цифрових даних об'єктивно підтверджує вірогідність розбіжностей значень різних показників, що вивчалися

Обґрунтованість та достовірність результатів дисертації підтверджена достатнім обсягом матеріалу та адекватним набором сучасних методів дослідження, в тому числі методів статистичного аналізу.

Послідовний виклад результатів дослідження, підтверджені отриманими результатами висновки, приведені в дисертаційній роботі, свідчать про закінчену наукову роботу, що має теоретичне і практичне значення.

5. Теоретичне та практичне значення роботи

Теоретична і практична цінність роботи полягає в тому, що одержані автором данні про особливості метаболізму кардіоліпіну в клітинах і тканинах щурів з віком та його взаємозв'язку з накопиченням кераміду в цих умовах сприяють розширенню уявлення про можливі причини розвитку патологічних станів, асоційованих з дисфункцією мітохондрій, та можуть бути перспективними для пошуку нових шляхів у подоланні вікових патологій. Крім того, отримані дані дозволяють припустити щільний зв'язок між рівнем

кардіоліпіну та появою депресивно-подібних ознак поведінки щурів. 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.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес кафедри фізіології людини і тварини біологічного факультету у рамках спеціального курсу «Клітинні системи сигнальної трансдукції» для студентів 1-го року навчання в магістратурі кафедри фізіології людини і тварин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (впровадження підтверджено відповідним актом).

6. Повнота викладу матеріалу дисертації в опублікованих працях і авторефераті

За темою дисертаційної роботи автором опубліковано 24 наукових праці, з яких 8 статей (2 наукових статті у виданнях, які входять до переліку 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. У публікаціях відображені всі основні положення дисертаційної роботи.

Автореферат містить усі положення дисертації, і у структурному й змістовному відношенні відповідає вимогам щодо кандидатських дисертацій.

7. Структура та зміст дисертації

Дисертація оформлена згідно вимогам до кандидатських дисертацій, викладена державною мовою на 182 сторінках комп'ютерного набору (з них основного тексту 120 сторінок) і складається з анотацій, переліку публікацій здобувача, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, розділу за результатами власних досліджень та їх обговорення,

висновків, списку використаних джерел у кількості 318 (95 – кирилицею; 223 – латиницею) та 2 додатків. Робота ілюстрована 4 таблицями і 30 рисунками, що покращує сприйняття викладених положень.

У вступі авторка висвітлює актуальність теми, формулює мету роботи та завдання дослідження, наукову новизну та практичне значення результатів дослідження. Крім того у вступі наведено зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Представлено перелік наукових форумів, на яких були апробовані результати та кількість наукових публікацій за темою дисертації.

В огляді літератури здобувачем здійснено аналіз першоджерел щодо структури та функціональної ролі кардіоліпіну та цераміду в клітинах і тканинах ссавців, наявність зв'язку між їх обмінами. Розглянуто роль кардіоліпіну в сигнальній трансдукції та особливості метаболізму цього фосфоліпіду в процесі онтогенезу і при різних патологічних станах. Автором проаналізовано наукові джерела щодо ролі цераміду у порушенні функціонального стану клітин і тканин. Проаналізовано данні щодо ролі кардіоліпіну і цераміду у тканинному диханні, функціональному стані мітохондрій, поділі клітин, апоптозі і відповіді на стрес. Аналіз літературних джерел дозволив здобувачу зробити висновок, що вивчення прямого та опосередкованого впливу цераміду на вміст кардіоліпіну у мітохондріях та функціонування цих органел є ключовим к розумінню порушень метаболізму в клітині та механізмів розвитку патологічних станів.

В розділі «Матеріали та методи дослідження», наведені дані щодо об'єкту дослідження, кількості щурів, що приймали участь в дослідженні, принципи їх розподілу на групи, що відповідає сформульованим завданням. Також наведені данні щодо постановки експерименту, методу утримання щурів на висококалорійному раціоні, збагаченому пальмітиною кислотою; метод утримання щурів на калорійно-обмеженому раціоні; метод культивування клітин; методи дослідження поведінки щурів; методи введення фармацевтичних препаратів та етанолу; ізотопний метод вивчення

синтезу кардіоліпіну в ізольованих гепатоцитах щурів; ізотопний метод вивчення транспорту глюкози у клітини та синтезу глікогену. Детально описані методи екстракції та кількісного аналізу ліпідів, виділення фракції мітохондрій, вивчення активності індикаторних ферментів у сироватці крові. Представлено дані щодо методів статистичного аналізу.

Використані фізіологічні, біохімічні та статистичні методи дослідження є сучасними та інформативними і дають можливість у повному обсязі розв'язати завдання, які поставила перед собою автор даної дисертаційної роботи.

"Результати власних досліджень та їх обговорення" викладені в одному розділі дисертації. Авторкою на підставі власних досліджень детально висвітлюються дані щодо ролі сфінголіпідів (а саме церамідів) у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі онтогенезу та старіння, а також розглядаються можливі методи попередження і корекції цих порушень.

У розділі власних досліджень викладені дані проведеного дослідження вмісту кардіоліпіну в умовах вікового або експериментального накопичення цераміду в клітинах серця, печінки та мозку 3-, 12-, 24-, 30-32-місячних щурів. Накопичення цераміду у клітинах та тканинах 3-місячних щурів досягалося збільшенням калорійності харчового раціону насиченими жирами, внутрішньочеревним введенням доксорубіцину або введенням внутрішньошлунково етанолу протягом 7 днів.

Наведені також данні другій серії експериментів, у якій вивчалися зміни вмісту кардіоліпіну під впливом підвищеної концентрації цераміду. Збільшення вмісту цераміду досягалося шляхом введення різних доз екзогенних церамідів (C2-, C-16, або C-18-церамідів до клітин та тканин 3-місячних щурів.

Наведені данні щодо вивчення можливостей корекції зніженого з віком вмісту кардіоліпіну за допомогою експериментальної калорійно-обмеженої дієти за Маккеєм-Нікітіним.

Приведено результати досліджень що до можливості зниження вмісту кераміду, викликаного введенням 40% етанолу, шляхом внутрішньошлункового введення поліненасичених жирних кислот риба'ячого жиру або кверцетину.

Представлено данні серії експериментів, у яких досліджували особливості поведінки 3- та 24-місячних щурів в тестах "Відкрите поле", "Темний/світлий відсік", "Перевага до розчину сахарози", "Годування в незнайомій обстановці", "Імобілізація за хвіст" та "Сплеш-тест" при віковому або експериментальному зниженні вмісту кардіоліпіну та збільшенні вмісту кераміду шляхом внутрішньоназального введення С16-кераміду.

Представлено данні щодо вивчення вмісту кардіоліпіну, кераміду та зміни поведінки 24-місячних щурів, яким протягом 14 діб інтраназально вводили інгібітор накопичення кераміду- N-ацетілцистеїн. Автором приведено данні щодо вивчення можливості корекції рівню кардіоліпіну в тканинах старих щурів за допомогою препаратів- іміпрамін, золедронова кислота або N-ацетилцистеїн.

Представлено данні серії експериментів по вивченню ефектів екзогенного кардіоліпіну на фізіологічний стан гепатоцитів, мозку та скелетних м'язів 24-місячних тварин. В цій серії експериментів клітини культивували протягом 1 години з екзогенним кардіоліпіном після чого до середовища культивації додавали інсулін та вивчали транспорт міченої глюкози.

Приведено данні щодо вивчення сполученої дії кардіоліпіну та кераміду на фізіологічний стан клітин 3-місячних щурів. Для досягнення цього гепатоцити, мозок, або литковий м'яз інкубували у присутності кераміду протягом 1 години, після чого ще 1 годину з додаванням кардіоліпіну, додавали інсулін і визначали транспорт міченої глюкози, включення глюкози до глікогену.

Висновки дисертаційної роботи повністю відповідають поставленим завданням та свідчать про завершеність роботи.

8. Ідентичність змісту автореферату й основних положень дисертації. Автореферат дисертації у повній мірі включає дані всіх розділів дисертації. Структура автореферату цілком відповідає структурі дисертації, а зміст автореферату – ідентичний до основних положень дисертаційної роботи. Висновки та практичні рекомендації, сформульовані у дисертації, достатньо обґрунтовані і логічно витікають з результатів дослідження.

9. Зауваження та побажання до дисертації і автореферату щодо їх змісту і оформлення.

Виникла необхідність задати автору кілька запитань:

1) Чи можуть виявлені Вами зміни у ліпідному складі мембран бути пов'язані з віковими змінами секреції тиреоїдних гормонів?

2) Чи можливо, на підставі отриманих Вами даних, припустити, що замість препаратів метаболічного ряду (ефективність яких досі не підтверджена) при ішемічній хворобі серця призначати інтраназальне введення кардіоліпіну.

Зауваження:

1) В роботі є серія експериментів, представлені численні дані досліджень, які обговорюються в ході їх викладу. В результаті, під час обговорення даних багаторазово повторюються одні й ті ж літературні відомості, наявні в огляді літератури. Звичайно, це покращує розуміння наведених трактувань результатів, однак, на мій погляд, доцільно було б обговорення результатів представити в окремому розділі.

2) На мою думку, не зовсім вдало представлені відомості про наукову новизну роботи. Не зрозуміло, які саме дані є новими.

3) З погляду на те, що в роботі є кілька серій логічно пов'язаних між собою експериментів і немає розділу "обговорення" доцільно було б представити у вигляді схеми механізм впливу цераміду на

функціональний стан клітин.

Зауваження і деякі недоліки дисертації не зменшують її наукову і практичну цінність.

10. Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам

Дисертація Стороженко Галини Валеріївни «Роль сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння», що представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин, є самостійним, закінченим науковим дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове вирішення актуального наукового завдання – визначення ролі сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння.

За актуальністю, обсягом проведеного дослідження, глибиною аналізу, новизною отриманих даних, обґрунтованістю і достовірністю висновків та положень дисертаційна робота Стороженко Галини Валеріївни «Роль сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння» відповідає вимогам пунктів 11 та 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України від 19.08.2015 р. № 656, від 30.12.2015 р. № 1159 та від 27.07.2016 р. № 567, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент
доцент кафедри біологічної хімії
Харківського національного
медичного університету,



канд. біол. наук, доцент Горбач Т.В.