



ВІДГУК
офіційного опонента

на дисертацію Крисюк Ірини Павлівни

«Порушення та засоби корекції метаболізму альдегідів за умов розвитку
патологій різного генезу»,

подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Згідно даних Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ) 70% летальних випадків припадає на ускладнення, які є наслідком хронічних захворювань, таких як діабет, атеросклероз, остеоартрити, нефропатії, септичні стани, колагенози, гепатити, онкозахворювання, кардіоваскулярні, легеневі, нейродегенеративні хвороби (Альцгеймера, Паркінсона тощо), в розвитку яких реакційноздатні альдегіди відіграють важливу роль, тоді як 80% передчасних захворювань можна запобігти. За численних патологічних процесів в організмі, пов'язаних з метаболічними порушеннями та екзогенними чинниками за вказаних патологій відбувається суттєве зростання в організмі рівня вільних низькомолекулярних карбонільних сполук. Альдегідні групи цих сполук легко взаємодіють з протеїнами, що спричиняє ковалентну модифікацію останніх, та призводить до втрати нативної структури та функціональної активності. Взаємопов'язаність карбонільного та оксидативного стресів пояснюють тим, що активні карбонільні сполуки, що, є продуктами оксидативного стресу і перекисного окиснення ліпідів, беруть активну участь у реалізації даних станів здійснюючи хімічну модифікацію і знижуючи активність ензимів антиоксидантного захисту, в тому числі. Модифікаційний вплив альдегідів не так широко досліджений та описаний порівняно з іншими постсинтетичними модифікаціями. Тому дослідження закономірностей карбонільного/оксидативного стресу та пошук речовин, які можуть зв'язувати токсичні альдегіди є важливим актуальним питанням біохімії, молекулярної біології та біомедицини. Сказаним визначається, що мета дисертаційної роботи Крисюк Ірини Павлівни з'ясування особливостей утворення аддуктів альдегідів

з протеїнами в досліджах *in vitro* та розвитку гіпер/гіпокарбонільного стану в організмі тварин, а також розробка засобів корекції цих станів, є актуальною. У відповідності до мети дисертанткою коректно сформовано задачі.

У роботі вперше було застосовано комплексний експериментальний підхід в моделях *in vitro* й *in vivo*, що дало можливість отримати нові знання та поглибити розуміння особливостей перебігу альдегід-індукованих трансформацій. Вперше проведено комплексне дослідження наслідків зміни концентрації альдегідів за низки патологічних станів на біохімічні процеси, асоційовані з метаболізмом біогенних амінів, та системи захисту організму тварин від оксидативно/карбонільного стресу. Встановлено, що альдегіди є важливим біохімічним чинником розвитку патологій, які супроводжуються карбонільним стресом, як за зменшення (латиризм), так і за збільшення (діабет, рабдоміоліз, перевивна карцинома Льюїс) їх концентрації. На тваринних моделях експериментально обґрунтовано ефективність застосування розроблених комплексних дієтичних добавок, скерованих на зменшення наслідків карбонільного та оксидативного стресу. Результати досліджень проведених дисертанткою дозволяють розширити існуючі уявлення про роль ендогенних альдегідів у модулюванні мережі регуляторних механізмів, причетних до розвитку оксидативно-карбонільного стресу за вказаних патологічних станів.

Матеріал дисертаційної роботи, що рецензується, викладено на 136 стор. комп'ютерного набору за традиційною схемою, а саме: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, заключення, висновки. Список цитованої літератури охоплює 172 найменування. Роботу проілюстровано 6 таблицями та 27 рисунками.

В огляді літератури детально проаналізовано метаболічні та молекулярно-генетичні механізми альдегід-опосередкованих постсинтетичних модифікацій протеїнів, причинно-наслідкові фактори, що призводять до їх появи та можливі інгібітори цих процесів.

Дисертанткою було акцентовано на біобезпечності препаратів, які використовуються в дослідженнях на різних моделях, що є необхідною

передумовою перспективності їх застосування та дозволить не тільки ефективно інгібувати формування кінцевих продуктів глікування, а й уникати негативних наслідків ксенобіотичного характеру. Було акцентовано, що специфічність та безпечність сполук, які інгібують утворення як самих реакційних карбонільних сполук, так і їх аддуктів на різних етапах перетворення, є важливим завданням сучасної біомедичної науки, з подальшим використанням їх у терапевтичній практиці.

Водночас, необхідно зазначити, що матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертанта та здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу.

При виконанні роботи дисертанткою застосовано потужний арсенал методичних підходів, таких як методи електронного парамагнітного резонансу, імуноензимного аналізу (ІФА), спектрофотометричні, флуоресцентні, електрофоретичні, ПЛР-аналізу, рентгенологічні. Результати досліджень піддавались статистичній обробці. Запорукою досягнення мети і основних завдань дисертаційної роботи стало використання різноманітних тваринних моделей розповсюджених захворювань (діабет, карцинома легень, латиризм) та синдромів (рабдоміоліз).

В проведених дослідженнях *in vitro* дисертанткою було вивчено закономірності утворення основних продуктів глікування альбуміну сироватки людини, лізину та желатини на різних етапах їх інкубації з такими альдегідами: метилгліоксаль, гліоксаль, дезоксирибоза, рибоза, формальдегід, акролеїн), та показано, що цей процес супроводжувався утворенням ранніх, проміжних та кінцевих продуктів реакції Майяра, які відрізнялись за своїми біохімічними, фізико-хімічними та спектральними характеристикам.

Отримані в роботі результати *in vitro* дають змогу стверджувати, що під впливом альдегідів відбуваються зміни в структурі протеїнів вже на ранніх строках інкубації: окислення, яке характеризує збільшення рівня утворених карбонільних груп, утворення численних хромофоровмісних сполук, про що свідчить інтенсивність флуоресценції, та перерозподіл фракцій протеїнів у високомолекулярну область за рахунок інтенсивного міжмолекулярного

зшивання. Карбонілювання протеїнів та утворення флуоресцентних аддуктів під дією альдегідів є процесами динамічними, різноспрямованими і, в результаті, синергічними за характером, тобто за умов комбінованої дії реактивних карбонільних сполук спостерігаються збільшення/зменшення кількості СО-груп протеїнів та зменшення/збільшення інтенсивності «блакитної» флуоресценції, відповідно, в порівнянні з дією кожного з ефекторів окремо. При цьому модифікувальні властивості альдегідів відрізняються і залежать від їх хімічної будови. Дисертанткою було встановлено рейтинг диференційної активності реактивних карбонільних сполук (від найактивнішої): метилгліоксаль, гліоксаль, дезоксирибоза, рибоза, формальдегід, акролеїн, та деякі особливості дії окремих альдегідів. Так, при взаємодії з колагеном або желатиною формальдегіду було виявлено антагонізм за умов комбінованої дії з іншими альдегідами щодо утворення флуоресцентних аддуктів, зокрема зменшення інтенсивності флуоресценції колагену в комбінації з метилгліоксалем у порівнянні з ефектом останнього на даний показник окремо. Антагоністичні властивості формальдегіду при комбінованій дії з іншими альдегідами можуть бути використані для послаблення модифікації структури компонентів позаклітинного матриксу та протеїнів при карбонільному стресі.

Вибір дисертантом адекватних методів для виконання поставлених завдань дозволив отримати принципово нову наукову інформацію, а аналіз літератури та співставлення даних, допомогли в створенні комплексних дієтичних добавок, які дають можливість зменшити наслідки карбонільного та оксидативного стресу і покращити перебіг змодельованих патологічних станів.

Враховуючи отримані дані щодо здатності альдегідів активно вступати в реакцію з аміногрупами протеїнів, а також дані літератури стосовно аналогічної реакції альдегідів з відновленими тіолами (цистеїном, GSH), дисертанткою було розроблено та застосовано препарат, який містить гліцин, лізин та потенційний акцептор альдегідів N-ацетил-L-цистеїн, з антиоксидантними та антитоксичними властивостями для нормалізації рівня ендогенних альдегідів та зменшення відповідних протеїнових модифікацій при гіперпродукуванні альдегідів. Антиоксидантна дія N-ацетилцистеїну пов'язана з властивістю

вільної SH-групи руйнувати внутрішньо- та міжмолекулярні S-S-зв'язки агрегатів глікопротеїнів. Відомо також, що ця сполука легко проникає в клітину та вивільняє L-цистеїн – амінокислоту, що необхідна для синтезу важливого низькомолекулярного антиоксиданту глутатіону. Водночас, антитоксичний ефект N-ацетилцистеїну може бути пов'язаний зі здатністю продуктів його метаболізму (цистин, цистеїн) утворювати ковалентні комплекси з альдегідами. Дослідним шляхом було визначено концентраційну залежність впливу цього препарату на вміст формальдегіду в гомогенаті печінки щурів, що було використано в подальших дослідях *in vivo*.

Дисертанткою було охарактеризовано карбонільний статус за декількох патологій, та запропоновані добавки, які покращують досліджені показники, що дозволяє характеризувати роботу не тільки, як фундаментальну, а як таку, що має вихід на практичне застосування.

В роботі за умов моделювання рабдоміолізу показано, що індукується потужний оксидативний стрес за рахунок вивільнення у кров'яне русло внутрішньоклітинного вмісту міоцитів та накопичення значної кількості окисленого заліза в крові, що не зв'язане із залізотранспортним протеїном – трансферином. Як наслідок цих подій, в організмі тварин було зафіксовано багаторазове підвищення рівнів реакційних карбонільних сполук, як маркера карбонільного стресу. При цьому N-ацетилцистеїн зменшував вплив цих карбонільних сполук на розвиток оксидативно/карбонільного стресу (як за вмістом продуктів, що реагують з ТБК, так і карбонільних груп протеїнів), що свідчить про причетність альдегідів до стимулювання та прискорення розвитку патології.

Гіперпродукування редукувальних моносахаридів, за діабету, та деяких інших хвороб, що призводять до порушень обміну речовин, супроводжується глюкозурією внаслідок чого посилюється утворення кінцевих продуктів глікування та кінцевих продуктів ліпидування, які прямо або через специфічні рецептори впливають на сигнальну трансдукцію, змінюють структуру і функції рецепторів, протеїнів позаклітинного матриксу, метаболічних ензимів та ензимів антиоксидантного захисту; викликають запалення і апоптоз, що

спричинює розвиток ускладнень при патологіях різного генезу. На моделі стрептозотоцинового діабету у щурів продемонстровано підвищення загального вмісту альдегідів в тканинах, що характеризує розвиток гіперкарбонільного стану. Рівень інтенсивності формування кінцевих продуктів глікування (за вмістом карбоксиметиллізину) свідчив про модифікації протеїнів внаслідок посилення карбонільного стресу, який супроводжувався розвитком оксидативного стресу (за вмістом протеїнових СО-груп, ТБК-активних продуктів, низькомолекулярних відновлених SH-метаболітів (цистеїн, глутатіон, тіосульфат та ін.) в тканинах тварин. Застосування «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» призводило до послаблення інтенсивності карбонільного стресу за рівнем вказаних вище показників, що довело ефективність розробленого терапевтичного засобу.

Як було показано на прикладі експериментальних моделей рабдоміолізу та стрептозотоцинового діабету, збільшення вмісту альдегідів вище фізіологічних меж було головним чинником розвитку ускладнень цих патологічних станів. У свою чергу, надмірне зниження цього показника та формування гіпокарбонільного стану також має драматичні наслідки для організму ссавців, що було продемонстровано на моделі латиризму, викликаного субхронічним введенням семікарбазиду піддослідним тваринам, який інтенсивно досліджується в різних лабораторіях з лікувальною метою. Однак, детальні механізми його біологічної дії до кінця не з'ясовані.

Результати проведених Крисюк І.П. досліджень свідчать, що довготривале введення щурам семікарбазиду призводить до суттєвого зниження ваги і співвідношення величин масового коефіцієнта органів, змін в архітектоніці скелету та мінеральному складі кісток, посилення катаболізму пуринів, прооксидантних процесів, зниження активності семікарбазидчутливої амінооксидази, супероксиддисмутази, концентрації альдегідів, збільшення активності глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази та лужної фосфатази. Інгібування активності лізілоксидази під дією семікарбазиду в організмі дослідних тварин, у свою чергу, призводить до значних змін в позаклітинному матриксі кісток, суглобів і шкіри, зокрема його колагенових структур, що було

однією з головних причин розвитку даної патології. Отримані дані не тільки підтверджують важливість підтримання рівня реактивних карбонільних сполук в організмі в фізіологічних межах, але й засвідчують можливість застосування семікарбазиду в терапевтичних цілях за умов розвитку патологічних станів, які супроводжуються гіперактивацією чутливих до даної сполуки ензимів.

Так, за умов розвитку карциноми легені Льюїс у мишей, використання модифікованого креатину (з концентрацією семікарбазиду 0,00024%) призводило до зниження рівня оксидативно/карбонільного стресу в тканині органу-мішені даної патології за рахунок пригнічення активності ключового ензиму модифікації структурно-функціонального стану позаклітинного матриксу, лізілоксидази, а також діаміноксидази та семікарбазидчутливої амінооксидази, і, як наслідок, пригнічення пухлинного процесу.

Одержані дисертанткою результати свідчать, що альдегіди є важливим біохімічним чинником розвитку патологій, які супроводжуються карбонільним стресом як за зменшення (латиризм), так і за збільшення (рабдоміоліз, стрептозотоциновий діабет, карцинома легень Льюїс) їх вмісту. На експериментальних тваринних моделях продемонстровано, що застосування комплексних дієтичних добавок, які розроблені в роботі дає можливість зменшити наслідки карбонільного та оксидативного стресу і покращити перебіг змодельованих патологічних станів.

Основні висновки дисертаційної роботи є добре аргументованими і відповідають представленому експериментальному матеріалу. Матеріали дисертації повністю відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на наукових конференціях.

Однак, незважаючи на позитивне враження від роботи в цілому, все ж виникають певні зауваження та запитання.

1. У розділі «Матеріали та методи» було б доречним надати повну інформацію про використані у дослідженнях всі дієтичні добавки у вигляді окремого пункту.

2. У розділі «Матеріали та методи» при описі центрифугування в ряді методів використовується швидкість обертання ротора, але доцільно було використовувати відносне центробіжне прискорення (g), оскільки для розрахунку обертів за хвилину необхідно враховувати радіус ротора центрифуги.

3. У розділі «Матеріали та методи» у підрозділі 2.9 «Флуоресцентна спектроскопія» не вказано визначення флуоресцентної спектроскопії саме якої сполуки.

4. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» ряд рисунків 3.2, 3.9, 3.10, 3.14, 3.15, 3.17 і таблиць 3.3, 3.5 завершує підрозділи, що є некоректним.

5. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» рисунок 3.10 має назву «Зміна концентрації формальдегіду в гомогенаті печінки щура», що є некоректним, оскільки змін може і не бути досліджуваного показника.

6. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» ряд рисунків 3.2, 3.4, 3.5, 3.7, 3.12, 3.14 має у назві спочатку обговорення рисунку, а потім у частини йде назва стосовно досліджуваного показника. Як приклад: рис. 3.2. «Рибоза утворює з L-лізином аддукти, що відрізняються за динамікою змін інтенсивності флуоресценції у часі ($\lambda_{ex}=360\text{нм}/\lambda_{em}=420\text{ нм}$)» або рис. 3.4. «Утворення флуоресцентних аддуктів та карбонільних груп у зразках альбуміну сироватки людини має різноспрямований характер і залежить від часу дії альдегідів та їх хімічної природи. Середні значення інтенсивності флуоресценції ($\lambda_{ex}=360\text{ нм}$, $\lambda_{em}=420\text{ нм}$) та вміст карбонільних груп у зразках альбуміну сироватки людини після інкубації в темряві при 37°C , з альдегідами ($n=3$) через 30 діб». Обговорення результатів краще було дати окремо.

7. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» ряд рисунків 3.5, 3.13, 3.23 та таблиця 3.6 розташовані у середині речення.

8. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» у підрозділі 3.3.1 «Біохімічна характеристика розвитку рабдоміолізу» та 3.4.2. «Ефективність «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані»

щодо зменшення інтенсивності карбонільного стресу на моделі СТЦД” немає обговорення отриманих результатів.

9. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» у підрозділі 3.6.1. «Біохімічна характеристика розвитку карциноми легені Льюїс» надана схема експерименту, яку варто було представити у розділі «Матеріали та методи».

10. У списку використаних джерел з 172 найменувань лише 19 посилань за останні 5 років.

11. Чому у дослідженнях за умов перевивної карциноми Льюїс при використанні модифікованого креатину брали концентрацію семікарбазиду саме 0,00024% ? Як це розраховувалось?

Проте, зроблені зауваження та поставлені запитання, в основному, мають дискусійний характер і суттєво не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Загальний висновок

У цілому кандидатська дисертація Крисюк Ірини Павлівни «Порушення та засоби корекції метаболізму альдегідів за умов розвитку патологій різного генезу», подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є завершеною науковою працею, в якій отримано результати, щодо розуміння особливостей перебігу альдегід-індукованих трансформацій.

Отримані результати доповнюють існуючі на сьогодні уявлення щодо ролі зміни концентрації альдегідів за низки патологічних станів на біохімічні процеси, асоційовані з метаболізмом біогенних амінів, та системи захисту організму тварин від оксидативно/карбонільного стресу.

На основі аналізу об'єкта дисертаційного дослідження, яким є порушення метаболізму альдегідів за умов розвитку патологічних станів різного генезу на тваринних моделях *in vivo* та розробка можливих підходів їх корекції, дисертант робить практичні та теоретичні висновки.

Зміст автореферату в цілому відповідає змісту дисертації.

Дисертація та автореферат оформлені відповідно до вимог, які ставляться до такого роду робіт.

На підставі всього викладеного вище дисертаційну роботу Крисюк Ірини Павлівни «Порушення та засоби корекції метаболізму альдегідів за умов розвитку патологій різного генезу» можна вважати такою, що за актуальністю, науковою новизною, обсягом виконаних досліджень, методичним рівнем та значимістю відповідає вимогам п. 9, 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабміну України від 24. 07. 2013 № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Д.б.н., с.н.с., зав. НДЛ «Біохімії»

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

К.О. Дворценко

*Підпис Дворценко К.О.
завідуючо
Василь Диренюра*

