



ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Гузика Михайла Михайловича за темою “Полі-АДФ-рибозилування ядерних протеїнів за цукрового діабету”**, подану до спеціалізованої ради Д 26.240.01 при Інституті біохімії ім. О.В Палладіна НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми дисертації. Майже 246 млн людей у світі мають цукровий діабет. За умов збереження існуючої тенденції число хворих до 2030 року зросте до 300 млн. Поширеність цукрового діабету у більшості розвинених країн вже сягає розмірів епідемії. Застосування пероральних протидіабетичних препаратів та інсуліну сприяли тому, що гострі ускладнення діабету стали нечастою причиною смерті хворих на діабет. Проте серйозним викликом залишаються мікросудинні ускладнення: нефропатія, ретинопатія, невропатія, кардіоміопатія тощо. Не дивлячись на інтенсивність досліджень та певні клінічні успіхи, проблема встановлення молекулярно-біохімічних механізмів порушення функцій клітин за цукрового діабету та розробки на їх основі підходів до лікування не стає менш актуальною. Достеменно не відомо, за яким механізмом гіперглікемія призводить до судинних ускладнень, проте, існує припущення, що має місце токсична дія на клітини ендотелію, що вистилає внутрішню поверхню кровоносних судин. Найважливішою ланкою взаємозв'язку між некомпенсованою гіперглікемією і структурно-функціональними порушеннями в ендотеліальних клітинах є активація оксидативного стресу за одночасного зниження циркулюючих антиоксидантів. Показано, що зумовлена гіперглікемією надпродукція реактивних форм кисню та азоту запускає ряд метаболічних порушень (вільнорадикальне окислення, неезиматичне глікування, карбонілювання, активація протеїнкінази С, глюкозамінового і поліолового шляхів, збільшення кінцевих продуктів гліколізу), що супроводжується посиленням запальних реакцій, порушеннями трофіки тканин за участю ростових факторів, ангіоактивних сполук тощо. За останніми даними серед патогенетичних механізмів розвитку клітинних

дисфункцій важлива роль належить полі-АДФ-рибозополімеразі-1 (PARP-1) - ключового ядерному ензиму у процесі репарації ушкоджень ДНК, що має місце за умов розвитку оксидативного та генотоксичного стресу, регулюванні експресії генів, інтеграції клітинних сигнальних шляхів, участі у протеасомній деградації протеїнів, програмі клітинної загибелі тощо. Проте, існуючі на даний час наукові факти не дозволяють чітко встановити значення PARP-1 та полі-ADP-рибозилування протеїнів у розвитку біохімічних і функціональних порушень у живих клітинах за діабету, які відбуваються за умов посиленого утворення активних форм оксисену (АФО) та нітрогену, окисних модифікацій протеїнів, запалення та порушення ангіогенезу. Відомо, що надмірна активність PARP-1 відіграє суттєву роль у патогенезі численних клінічних станів, таких як інсульт, інфаркт міокарду, запалення, діабет і нейродегенеративні розлади. Не дивлячись на широкий спектр інгібіторів PARP-1, у літературі недостатньо висвітлено, на які саме ланки клітинних процесів вони діють залежності від структури, а також щодо їх ефективності при лікуванні ЦД та його ускладнень.

Дисертаційна робота виконана в межах плану наукових досліджень відділу біохімії вітамінів та коферментів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України у відповідності з напрямом науково-дослідних робіт Інституту за темами: «Дослідження молекулярних механізмів реалізації біологічної ролі вітамінів, коферментів та їхніх протеїнів-акцепторів у забезпеченні функціонування та життєздатності клітин за норми та за умов деяких патологій» (№ держреєстрації 0107V003251) та «Роль вітамінів А, Е, В1, РР, D3 убіхінону та їх коферментів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (№ держреєстрації 0112U002625).

Ступінь обґрунтованості положень і висновків, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню ролі PARP-1 та полі-ADP-рибозилування протеїнів у розвитку асоційованих з діабетом молекулярно-біохімічних та клітинних порушень (оксидативний стрес, запалення, судинна дисфункція, загибель клітин) у різних органах.

Значний за обсягом матеріал дисертації викладено у п'яти розділах досліджень, де послідовно обґрунтовується основне положення роботи, а саме: за цукрового діабету відбуваються зміни вмісту PARP-1 та полі-ADP-рибозилування протеїнів, які носять тканино-залежний характер і здебільшого корелюють з розвитком оксидативного стресу, прозапальним станом в організмі, продукуванням ангіостатинів та розвитком реактивного астрогліозу.

Оригінальність обраного в дисертаційній роботі підходу полягає у застосуванні 1,5-ізохіноліндіолу, нікотинаміду та 3-амінобензаміду як інгібіторів PARP-1, здатних ефективно гальмувати процес полі-ADP-рибозилування протеїнів, що дає можливість оцінити роль даної ковалентної модифікації протеїнів у розвитку молекулярно-біохімічних та клітинних порушень за умов цукрового діабету. Крім того, вдалим є обрання первинної культури острівцевих клітин та клітин лінії RINm5F в якості модельних систем для дослідження прооксидантної та цитотоксичної дії глюкози і стрептозотоцину, а також використання моделі стрептозотоцинового цукрового діабету 1 типу, яка характеризується інтенсифікацією утворення активних форм кисню (АФО), розвитком генералізованого оксидативного стресу та запалення. Важливим є те, що експериментально обґрунтовано застосування декількох інгібіторів PARP-1 з дещо відмінним механізмом їх дії.

Для виконання даної роботи було досить вдало обрано цілком адекватні методи для вирішення поставлених завдань, що дозволило автору отримати достовірні експериментальні результати.

Так, застосування цитологічних методів дослідження, протокової цитометрії дозволило оцінити життєздатність острівцевих клітин, рівень їх функціональної активності та інтенсивність утворення АФО і встановити концентраційнозалежні ефекти інгібіторів PARP-1 на виживання та продукцію АФО. Дисертантом встановлено, що внесення до середовища культивування клітин стрептозотоцину, пероксиду водню або підвищення концентрації глюкози призводить до розвитку оксидативного стресу, що супроводжується посиленням загибелі клітин. Виявлено дозозалежну дію нікотинаміду його

антиоксидантний та цитопротекторний ефект на острівцеві клітини підшлункової залози за дії стрептозотоцину в концентрації 5 ммоль/л.

За допомогою біохімічних і молекулярно-біологічних методів (Вестерн-блот аналіз, ПЛР) вперше комплексно досліджені тканинні особливості процесу полі-ADP-рибозилування протеїнів ядер клітин та експресії PARP-1 за умов цукрового діабету, що відбуваються на тлі інтенсифікації оксидативного стресу, розвитку запальних процесів, пригнічення активності системи антиоксидантного захисту. Встановлено, що найбільш виражені патологічні зміни відбуваються у мозку та у ретині ока діабетичних щурів. З використанням методів імуногістохімії показано, що пізні ускладнення ЦД супроводжуються патологічними змінами в сітківці ока діабетичних щурів, зумовленими структурною перебудовою протеїнів цитоскелету та порушенням ангиогенезу (неоваскуляризацією). Застосування структурно-відмінних інгібіторів PARP-1 за ЦД призводило до часткової або повної нормалізації біохімічних та клітинно-функціональних змін, ефективність дії яких за ретинопатії виявилась найвищою.

Проаналізовано і зареферовано 240 джерел наукової літератури. Переконливі результати з адекватним використанням методів статистичної обробки зумовили високу статистичну значущість, на основі яких дисертант обґрунтував положення та висновки.

Все це однозначно свідчить, що висунуті автором наукові положення і висновки досить обґрунтовані, достовірні, впливають з проаналізованого фактичного матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані.

Наукована новизна отриманих результатів. Дисертаційна робота Гузик М.М. являє собою дослідження, яким експериментально доведено, що порушення процесів полі-ADP-рибозилування протеїнів за цукрового діабету 1 типу носить тканино-залежний характер і корелює з розвитком оксидативного стресу, прозапальним станом, утворенням ангиостатинів та розвитком реактивного астрогліозу. Встановлено, що найбільш чутливими у діабетичних щурів є мозок та сітківка ока. Продемонстровано, що активація процесів полі-ADP-рибозилування та зниження вмісту NAD^+ супроводжується посилення

фрагментації PARP-1 та зростанням рівня NAD^+ -залежної деацетилази SIRT2, що характеризує розвиток нейродегенеративних процесів у мозку щурів. Встановлено, що клітини сітківки ока можуть виробляти різні ізоформи ангіостатинів. Показано, що нормалізація процесу полі-ADP-рибозилування протеїнів супроводжується зниженням фрагментації як самої PARP-1, так і гліального фібрилярного кислого протеїну, а також підвищенням вмісту ангіостатинів, результатом чого може бути пригнічення процесів неоваскуляризації.

Важливість для науки і практики отриманих автором результатів. Результати досліджень науково обґрунтовані та мають важливе теоретичне і практичне значення. Теоретичні положення, сформульовані при аналізі отриманих результатів, поглиблюють уявлення про біохімічні механізми участі полі-ADP-рибозилування протеїнів у патогенезі ЦД та його ускладнень, пов'язаних з розвитком оксидативно-нітрозативного стресу, інтенсифікацією загибелі клітин та посиленням запальних процесів.

Отримані дані можуть стати експериментальним обґрунтуванням можливості практичного застосування інгібіторів PARP-1 як потенційних показників для оцінки ролі реакцій полі-ADP-рибозилування протеїнів щодо різних біохімічних, молекулярно-біологічних і сигнальних станів процесів у клітинах. Оскільки кінцевою метою більшості робіт, присвячених проблемі цукрового діабету, є пошук шляхів корекції асоційованих з даною патологією порушень, то у якості одного з ефективних підходів, що ґрунтується на результатах, отриманих дисертантом, може бути потенційне застосування нікотинаміду та інших інгібіторів як терапевтичних засобів у клініці ЦД та його ускладнень.

Результати досліджень впроваджено в навчальний процес кафедри біоорганічної та біологічної хімії Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах. Основні результати експериментальних досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, повною мірою висвітлені у 16 публікаціях, з

них 6 наукових статей - у вітчизняних та зарубіжних фахових виданнях журналах періодичних наукових, затверджених переліком рекомендованих видань, та 10 тезах доповідей - у збірниках матеріалів конференцій.

Аналіз основного змісту опублікованих робіт дозволяє зробити висновок, що всі наукові положення і висновки дисертації відображені в опублікованих працях.

Рекомендації щодо використання результатів та висновків. Дані досліджень, отримані у рамках виконання дисертаційної роботи, можуть бути використані в науковій та навчальній роботах науко-дослідних установ установ вищих навчальних закладах медико-біологічного профілю.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 140 сторінках, побудована в традиційному стилі і складається з вступу, огляду літератури, характеристики матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень та їх обговорення, проілюстрованих 52 рисунком та 1 таблицею, висновків та списку використаних джерел. Дисертаційна робота написана грамотно, на належному науковому рівні, із залученням для обговорення отриманих результатів значної кількості оригінальних статей вітчизняних та зарубіжних авторів. Критично проаналізовані публікації провідних наукових лабораторій, які працюють над даною проблемою.

Огляд літератури докладний і структурований, автором чітко охарактеризовані невивчені на сьогодні або сумнівні аспекти, що стосуються існуючих уявлень про патогенез цукрового діабету. Наведено інформацію про внесок ендогенних та екзогенних факторів виникнення гіперглікемії, роль оксидативного і нітрозативного стресу, дисбаланс вазоактивних речовин. До того ж у огляді проаналізовано участь полі-ADP-рибозилування ядерних протеїнів в механізмах розвитку цукрового діабету та можливість застосування інгібіторів PARP-1 як потенційного способу терапії даного захворювання.

У розділі «Матеріали і методи досліджень» автором приведений дизайн дослідження, вказано спосіб моделювання цукрового діабету та наведено використані адекватні моделі *in vitro*, зокрема культивування острівцевих клітин підшлункової залози щурів, клітин лінії RIN-m5F. В роботі використано

адекватну клінічним проявам модель цукрового діабету 1 типу, індукованого введенням щурам стрептозотоцину. Для оцінки каскаду діабетичних порушень у тварин використані сучасні біохімічні, молекулярно-біологічні, імуногістохімічні, гістологічні, інструментальні методи досліджень. Для статистичного аналізу отриманих результатів дисертант застосував сучасний пакет комп'ютерних програм.

При наведенні результатів власних досліджень в розділі 3 проаналізовано ряд критеріальних показників розвитку цукрового діабету 1 типу у щурів (рівень глюкози крові, маса тіла, про- та антиоксидантний статус організму, вміст цитокінів, структурно-морфологічний стан підшлункової залози) та вплив на ці параметри інгібіторів PARP-1. Показано, що уведення останніх сприяло зниженню рівня активних форм кисню, моноцитарного хемотаксичного протеїну-1, що свідчить про протизапальну ефективність 1,5-ізохінолініндіолу, а також цитопротекторну та регенеруючу дію стосовно β -клітин підшлункової залози. У розділі 4 в дослідях *in vitro* надано характеристику впливу інгібіторів PARP-1 на життєздатність острівцевих клітин підшлункової залози та інсулінпродукуючих клітин лінії RIN-m5F на тлі експозиції стрептозотоцину. Показано, що з огляду на відмінності фізіологічних характеристик нативних і трансформованих клітин і різних механізмів їх загибелі цитопротекторна дія нікотинаміду як інгібітора PARP-1, з одного боку, і антиоксиданта – з іншого, виявлена стосовно острівцевих клітин підшлункової залози. У розділі 5 поданої на рецензію роботи досить ґрунтовно проаналізовано стан полі-ADP-рибозилування та суміжних з ним процесів в тканинах міокарду, печінки, мозку і сітківки ока за цукрового діабету 1 типу у щурів, а також проведена комплексна оцінка коригуючої дії інгібіторів PARP-1. Встановлено тканинну специфічність полі-ADP-рибозилування ядерних протеїнів за цукрового діабету 1 типу: відсутність достовірних змін експресії мРНК і вмісту PARP-1 у міокарді, фрагментація зазначеного ензиму в печінці, підвищення його активності в ядрах тканин головного мозку та сітківці. Введення інгібіторів PARP-1 сприяло нормалізації зазначених порушень. Важливим результатом досліджень даного розділу є встановлення зв'язку між активацією полі-ADP-

рибозилування, реактивним гліозом та ангиогенезом за діабетичної ретинопатії і здатності інгібіторів PARP-1 пригнічувати аномальну неоваскуляцію у сітківці ока за цукрового діабету.

Матеріал, викладений в дисертаційній роботі, в цілому, відповідає меті та завданням досліджень. Таблиця і рисунки, наведені в дисертації, логічно доповнюють її основний зміст. Достатня кількість використаних літературних джерел, глибина їх аналізу свідчать, що дисертант добре володіє теоретичними знаннями, експерименти логічно сплановані і використані адекватні сучасні методи дослідження. Застосований метод статистичного аналізу дав змогу вірно інтерпретувати експериментальні дані і зробити обґрунтовані висновки, що логічно випливають з результатів досліджень і повністю відповідають положенням, сформульованим у меті та завданнях досліджень. Робота написана чіткою науково-літературною мовою, список літератури складається, головним чином, із сучасних наукових джерел.

За змістом дисертація має завершений характер як самостійна науково-дослідна розробка. Сукупність експериментальних досліджень і теоретичних положень роботи є суттєвим внеском у вирішення важливої наукової проблеми – встановлення ролі та полі-ADP-рибозилування протеїнів у розвитку молекулярно-біохімічних та клітинних порушень за цукрового діабету.

Разом з тим до дисертаційної роботи виникли деякі зауваження і запитання, а також побажання в рамках наукової дискусії.

Зауваження:

1. Дисертація дещо перевантажена умовними скороченнями, що ускладнює її сприйняття.
2. У розділі 2 “Матеріали і методи” деякі з описаних методів є надто деталізованими.
3. При достатньо повному дослідженні рівня полі-ADP-рибозилування протеїнів та тканинного вмісту PARP-1 доцільно було б розширити спектр показників, які характеризують наявність оксидативного стресу, що є важливим чинником активації PARP-1.

4. При обговоренні результатів аналізу вмісту деацетилаз SIRT1 і SIRT2 у ядерному екстракті мозку щурів недостатньо висвітлені особливості їх функціонування у порівнянні з іншими деацетилазами. До того ж, з огляду на здатність зазначених сіртуїнів інгібувати PARP, конкурувати з останньою за НАД⁺, впливати на метаболізм глюкози і інсулінорезистентність, регулювати утворення активних форм кисню і активність антиоксидантних ензимів, обговорення безперечно цікавих даних, отриманих дисертантом, могло б бути більш розлогим.

Однак, наведені зауваження і побажання принципово не впливають на загальну позитивну оцінку представленої до захисту дисертаційної роботи, а також не зменшують її високу наукову і практичну значимість.

У рамках дискусії хотілося б отримати відповіді на такі питання:

1. Відомо, що цукровий діабет супроводжується активацією процесів запалення. Як можна пояснити відсутність змін вмісту прозапальних цитокінів, інтерлейкіну-1 і фактору некрозу пухлини альфа і зростання протизапального інтерлейкіну-4 у сироватці крові щурів за цукрового діабету 1 типу?

2. Відсутнє теоретичне або експериментальне обґрунтування вибору доз інгібіторів PARP-1 – нікотинаміду і 1,5-ізохіноліндіолу. Чи не доцільно було б провести дослідження дозозалежності інгібіторної активності зазначених сполук для вибору оптимальної ефективної дози.

3. Слід бути більш обережним у констатації того, що біотрансформація нікотинаміду відбувається без участі цитохрому P-450 2E1, оскільки є дані, що нікотинамід-*N*-оксид може слугувати біомаркером активності даної ізоформи. Можливо має місце субстратне інгібування, і для об'єктивного висновку поряд з вестерн-блот аналізом доцільно було б дослідити експресію мРНК і ензиматичну активність цитохрому P-450 2E1?

Висновок. Дисертаційна робота Гузика Михайла Михайловича “Полі-ADP-рибозилування ядерних протеїнів за цукрового діабету” є самостійним, завершеним науковим дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове розв'язання важливого наукового завдання. За актуальністю, об'ємом, використаними

методами дослідження, новизною отриманих даних, можливістю їх практичного використання, коректністю та достовірністю зроблених висновків в цілому відповідає вимогам п.п. 11, 12 “Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а її автор заслуговує присвоєння шуканого ступеня за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент:

Завідувач відділу загальної токсикології
ДУ “Інститут фармакології та токсикології
НАМН України”, доктор біологічних наук,
професор



Коваленко В.М.

11.03.2016 р.

