



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 (091 – біологія)

Актуальність теми дисертаційної роботи. Альдегіди належать до найбільш реакційно здатних біоорганічних сполук. Вони об'єднують досить різноманітну групу речовин як за кількістю, так і локалізацією, що утворюються в процесі деградації біомолекул та можуть потрапляти у організм як ксенобіотики. Незважаючи на позірну простоту, механізми взаємодії реактивних карбонільних сполук з біологічними структурами залежно від їх локалізації та їх роль у патогенезі численних метаболічних, нейродегенеративних, імунних, онкологічних захворювань та ментальних ускладнень залишаються далекими від вирішення (Kamps et al., 2019). Токсичність цих альдегідів зумовлює їх здатність до неензимного приєднання за карбонільною групою з аміно та тіоловими групами протеїнів та нуклеїнових кислот, що призводить до утворення стабільних кінцевих продуктів. З іншого боку, реактивні альдегіди можуть відігравати роль у сигнальних ланцюгах окисного стресу. Про актуальність пошуків засобів корекції карбонільного стресу свідчить такий факт, що препарат метформін першої лінії при діабеті II типу за вмістом у поверхневих водах (Греції, Кореї, Гренландії (!)) належить до десятка головних біологічно активних сполук, сягаючи вмісту 0.06–129 мг/л. Відтак, пошук засобів корекції патогенного впливу як неензимного глікування, так і ензимного карбонілювання протеїнів серед сполук різних класів із застосуванням

багатоманіття експериментальних моделей є виправданим та набуває дедалі більшого наукового та соціального значення.

Зв'язок теми з державними і галузевими програмами. Робота виконувалась значний період часу – з 2008 р, у відповідності з напрямом науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України в рамках бюджетних тем відділу регуляції обміну речовин та відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України «Дослідження ролі взаємозв'язку між метаболізмом формальдегіду і оксиду азоту в механізмі їх токсичної дії» (№ держреєстрації 0108U0001122, 2008-2009 рр.); «Структурні зміни колагену позаклітинного матриксу як чинник регуляції функціонування стромально-гемопоетичного комплексу і процесів мінералізації кісткової тканини» (№ держреєстрації 0107V007187, 2007-2011 рр.); «Порівняльне дослідження біологічної дії ендогенних альдегідів як регуляторів метаболізму та чинників його порушень при патологічних станах різного генезу» (№ держреєстрації 0110U002700, 2010-2014 рр.); «Роль амінооксидаз у розвитку карбонільно-оксидативного стресу за патологій різного генезу» (№ держреєстрації 0115U003644, 2015-2017 рр.), «Вивчення особливостей зміни стану позаклітинного матриксу як показника розвитку онкологічного процесу та розробка шляхів його корекції» (№ держреєстрації 0117U004344, 2017-2021 рр.). Цей перелік засвідчує державну значимість теми дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у системному дослідженні утворення продуктів глікації та карбонілювання протеїнів за аномалій метаболізму біогенних карбонільних сполук та на різних експериментальних моделях. В результаті дисертанткою було виявлено системні закономірності цих процесів, важливі для розуміння механізмів посттрансляційних модифікацій протеїнів за патологій різного генезу.

Практичне значення і перспектива роботи полягає у експериментальному обґрунтуванні ефективності застосування розроблених дієтичних добавок на основі сполук різних класів, здатних як блокувати

карбонільні сполуки, так і інгібувати активність ензимів, що каталізують їх утворення.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації. Дисертація виконана на великому обсязі експериментального матеріалу з використанням сучасних методів дослідження окисного стресу та модифікацій протеїнів, адекватних меті та завданням роботи. Результати проведених досліджень статистично опрацьовані. Усі наукові положення цілком обґрунтовані, висновки відповідають поставленим задачам та змісту роботи і повністю відображають результати. Матеріали дисертаційної роботи у повному обсязі відображені у 15 роботах, з них 7 статей, опублікованих у фахових закордонних та вітчизняних наукових виданнях, що включені до переліку, затвердженого ДАК України, та 8 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних з'їздів та конференцій. За матеріалами дисертації отримано 3 патенти на корисну модель.

Структура роботи

Дисертацію викладено на 136 сторінках комп'ютерного набору, з яких 81 стор. займає основна частина. Результати роботи проілюстровано 6 таблицями та 27 рисунками. Робота складається зі вступу, огляду наукової літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, п'яти висновків та списку використаної літератури, який включає 172 посилання.

Аналіз змісту дисертаційної роботи свідчить, що дисертантка послідовно обґрунтувала доцільність запропонованої схеми дослідження та отримала переконливі результати. У Вступі чітко окреслено сферу дослідження та її актуальність: проблему неензимного глікування та карбонілювання протеїнів як процесів, залучених до розвитку патологій різного генезу та вікових змін. Задачі відповідають меті створення різних моделей аномалій, пов'язаних з надлишковим карбонілюванням чи глікуванням протеїнів, або його пригніченням та способами корекції. Перелік

положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

Огляд літератури (Розділ 1) складається з чотирьох підрозділів, присвячених метаболізму альдегідів, їх реакційній здатності у реакціях карбонілювання, можливості регулювати ці реакції та використовувати для діагностики патологій. Загалом, огляд містить сучасну інформацію, необхідну для коректної інтерпретації результатів дослідження. Демонструються причини та наслідки карбонільного стресу (1.1), детальна класифікація та оцінка кінцевих продуктів неензимного глікування (КПГ) (1.2), розглядаються можливості регуляції утворення та знешкодження токсичних продуктів (карбонільні пастки) (1.3), наводиться опис патологій, асоційованих зі змінами у метаболізмі альдегідів та їх клінічних проявів, взаємозв'язку між карбонільним та окисним стресами за патологій (1.4). Разом з тим, подекуди трапляється нечіткість формулювань, або причинно-наслідкова невідповідність. Наприклад, (с 30), реактивні карбонільні сполуки це не лише альдегіди (альдоза), але й кетози, причому останні навіть більш реакційно здатні. Неодноразово повторюється теза, що «альдегіди ... залежно від концентрації, можуть відігравати регуляторну роль або проявляти токсичні властивості». При цьому мало присвячено уваги їх метаболічній ролі, як найбільш реакційно здатним і пластичним джерелам атомів карбону. Не деталізуються такі складові їх дії як метаболічний контроль, модифікації протеїнів як апоптичний сигнал. У огляді не згадується про локалізацію реакцій неензимного глікування (на відміну від ензимного глікозилювання, наприклад, за утворення глікопротеїнів). Вважаю також, що метилгліоксаль (піруватальдегід) заслуговує на більш послідовне висвітлення утворення та утилізації. Стосовно згаданих реакцій «одновуглецевого обміну амінокислот» (с. 30), то ймовірність утворення формальдегіду при реакціях фолатів та метіоніну у транспорті однокарбонних груп також потребує деталізації.

Незрозуміле твердження (с. 30, 38 (повтор)): «За активації перекисного окиснення ліпідів та/або гіперглікемії утворюються різні альдегіди, які, залежно від концентрації, можуть відігравати регуляторну роль або проявляти токсичні властивості. Перш за все, до них відносять моносахариди.....». Також потребує деталізації механізм автоокиснення глюкози з огляду на стабільність її циклічної форми у клітинах.

Загалом, Огляд охоплює всі потрібні теоретичні положення, що використовуються на наш час, для оцінки карбонільного стресу, спричиненого альдегідами, та, відтак, забезпечує мотивацію подальшого дослідження молекулярних механізмів розвитку карбонільного стресу, обрання коректних моделей та пошуку потенційних сполук для елімінування токсичних аддуктів.

У розділі 2 подано детальну інформацію про використані експериментальні моделі. На кожній моделі забезпечувалися негативні контролю. Проте у досліді *in vitro* варто було простежити властивості пептидів, які зберігалися протягом 30-60 діб за температури 37°, хоча і за присутності бактеріостатика азиду. Загалом дисертанткою використано великий набір класичних біохімічних, фізико-хімічних методів, зокрема спектрофотометричного та флуоресцентного аналізу, електрофорезу у ПААГ, імуноблотінгу, електронного парамагнітного резонансу, імуноензимного аналізу, ПЛР-аналізу, рентгенологічні, статистичні. Визначено активності (а також, для лізилоксидази, рівень експресії) великого спектру ензимів метаболізму амінокислот та альдегідів.

Розділ 3 присвячено результатам дослідження та їх обговоренню.

У підрозділі 3.1. у досліді *in vitro* переконливо доведено, що неензимні взаємодії альдегідів з лізином та протеїнами відбуваються не лише в результаті ланцюга реакцій, індукованих АФК, тобто неоксидативним шляхом, а характер утворених продуктів залежить від природи альдегідів та їх поєднання та не обмежується карбонільними модифікаціями. Оскільки традиційно карбонілювання - це маркер окисного стресу, цей дослід

особливо важливий у доказовій базі. Вдалим є підбір досліджуваних молекул – лізину для оцінки реакцій за аміногрупою радикалу, пептидів колагенової природи та альбуміну як найбільш вразливих позаклітинних протеїнів, причому колаген-похідного як протеїну з великим інтервалом життя. При обговоренні результатів утворення СО-груп неоксидативним шляхом варто було залучити роботу Curtis et al, 2012 (Trends in Endocrinology & Metabolism. 2012 23(8):399). Також варто було в аргументації використати інформацію про відносні гідрофобність та електрофільність досліджених альдегідів, яка визначає їх токсичність (Niknahad et al., 2003). Разом з тим, поєднання методів аналізу свідчить, що здатність до карбонілювання і полімеризації для різних досліджених альдегідів не співпадає.

При цьому цікаво, що досліджена дієтична добавка, як описано у підрозділі 3.2, яка містила гліцин, лізин та N-ацетилцистеїн, забезпечила за цих умов нормалізацію рівня альдегідів та зменшення відповідних постсинтетичних протеїнових модифікацій в системі *ex vivo*, що стало передумовою її подальшого застосування на моделях патологій тварин.

У підрозділі 3.3 було доведено, що створена модель рабдоміолізу відповідає стану гіперкарбонільного стресу, а саме проявляється у суттєвому підвищенні загального вмісту альдегідів у тканині печінки щурів, протеїнових СО-груп в сироватці крові та тканині печінки, а також продуктів пероксидації ліпідів, зростала активність ензиму семікарбазидчутливої амінооксидази (CAO), що каталізує утворення формальдегіду. При цьому пригнічувався антиоксидантний захист, зокрема каталазна активність у нирках. Важливо, що дія дія N-ацетил-L-цистеїну (АЦЦ) призвела до зменшення патологічних проявів, зниження утворення формальдегіду у CAO-залежній реакції. Відтак, доведено, що реактивні альдегіди, зокрема формальдегід, відіграють важливу роль у патогенезі рабдоміолізу, а їх блокування є ефективним шляхом корекції патології. Припущення про зв'язуванням лабільного заліза в залізо-сірчаний (насправді сірчистий) комплекс, так і утворення ковалентних зв'язків між формальдегідом та

тіолами як механізм детоксикації альдегідів за гіперкарбонільного стану потребує додаткової аргументації, оскільки в літературі існує інформація про конкуренцію тіолів з іншими групами у взаємодії з формальдегідом (наприклад, Trezl et al., 1988).

У підрозділі 3.4 розглядається можливість корекції гіперкарбонільного стану розробленою комплексною дієтичною добавкою на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету. Коректність моделі була доведена отриманими результатами, оскільки у щурів з модельованим цукровим діабетом спостерігали істотне підвищення загального вмісту альдегідів в печінці та вмісту карбоксиметиллізину - продукту карбонілювання залишків лізину - у плазмі крові. Очевидно, що комплексна дієтична добавка, застосована для корекції, що містить гліцин, лізин та АЦЦ, повинна посилювати детоксикувальну дію АЦЦ, оскільки посилює спектр функціональних груп для зв'язування та забезпечення адекватного значення кислотності середовища. Отримані результати виявили значний рівень нормалізації показників карбонілювання та окисного стресу в крові та тканині печінки, причому рівень низькомолекулярних тіолів у печінці зріс. Твердження (с. 94) «Зміни (рівня цих тіолів) можуть свідчити про безпосередню участь ендogenous альдегідів у регулюванні пулу тіоловмісних сполук» потребує деталізації. Існує ймовірність, що введений АЦЦ у великій кількості, як прекурсор цистеїну, може активувати синтез глутатіону.

Модель латиризму, незважаючи на давню історію захворювання (про що прекрасно написано у науково-популярному виданні («Нариси про потрійну спіраль» (Очерки о тройной спирали», В.Н. Никитин, Е.Є. Перский, Л.А. Утевская), залишається науково привабливою. Дисертантка продемонструвала, що введення хелатора альдегідів та інгібітора альдегідоутворювальних ензимів – семікарбазиду протягом 45 діб призводить до суттєвих анатомічних та фізіологічних патологій в організмі щурів. На біохімічному рівні спостерігались порушення просторової структури фібрилярних глікопротеїнів та глікозаміногліканів, причому,

поряд із пригніченням утворення альдегідів, активувалось їх окиснення глутатіонзалежною формальдегіддегідрогеназою. Разом з тим, спостерігалось посилення процесів прооксидації та утворення вільних радикалів, яке, проте, не супроводжувалось генеруванням малонового диальдегіду. При цьому рівень ланцюгів колагену навіть істотно зростав, тоді як рівень димерів – зменшувався, тобто поперечні зшивки не утворювалися. Відтак, було показано, що гіпокарбонільний стрес, не зважаючи на блокування утворення альдегідів, також призводить до окисного стресу, а прояви останнього у моделі латиризму, очевидно, заслуговують на детальніше вивчення.

Ще одна модель, пов'язана зі змінами у вмісті реактивних альдегідів, розглянута у підрозділі 3.6. Це карцинома легені Льюїс, за якої спостерігається гіперкарбонільний стан. Дослідження на цій моделі було проведено з метою з'ясувати можливість модулювання активності альдегідоутворювальних ензимів препаратом, розробленим на основі модифікованого креатину. Як було показано у підрозділі 3.5, семікарбазид ефективно блокує утворення альдегідів, що мотивує його використання для зменшення карбонільного стресу у даній моделі. Як відомо, креатин, що широко використовується, як харчова добавка, володіє здатністю активувати антипухлинний потенціал імунних клітин (CD8 T) (Pereira et al., 2015). Тому нові дані про його вплив на розвиток пухлин самі по собі являють інтерес. Дисертантка запропонувала модифіковану добавку, яка крім креатину містить семікарбазид, що забезпечує пригнічення карбонільного стресу, навіть за низького його відсоткового вмісту $0,24 \cdot 10^{-3} \%$. Отримані результати показали, що дія добавки має значно вищу ефективність ніж власне креатину, що, очевидно, пов'язано з пригніченням патологічних модифікацій позаклітинного матриксу завдяки інгібуванню лізілоксидози, діаміно- та поліамінооксидаз. Цікавими є дані, що рівень експресії лізілоксидози зростав, тобто можливий вплив міг проявлятися на постсинтетичному рівні.

В узагальнюючому підрозділі здійснено інтегральний аналіз (Рис. 3.24) отриманих результатів та сформульовано висновок про ефективність

запропонованих методів корекції патологічних станів шляхом регуляції інтенсивності карбонільного стресу. Проте цей підрозділ значно виграв би за умови використання джерел літератури для посилення аргументації, наприклад, щодо ефективності застосування АЦЦ, який широко застосовується у різних медичних галузях.

Дисертантка формулює п'ять висновків, які адекватно відображають суть проведених експериментів.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка питань дискусійного характеру та зауважень до оформлення.

1. При обґрунтуванні теоретичних засад роботи бажано було би використати схеми реакцій альдегідів з утворенням продуктів Майяра та Акаборі, порівняти реакційну здатність аміно та тіолових груп у реакціях карбонілювання та глікування.
2. Подекуди трапляються некоректні вислови. Так, (с. 98) йдеться про незмінну кількість субодиниць колагену, а не про первинну структуру.
3. Текст дещо переобтяжений аббревіатурою, а її вживання не завжди вчасне (С 45 ФА – формальдегід), у авторефераті (LOX, тощо).
4. Щодо застосованих методів та відповідних посилань. У авторефераті зазначається, що вміст протейінових карбонільних груп визначали за методом (Levine et al., 1990) у модифікації (Зайцева і ін., 2012), насправді це Зайцева О.В, Шандренко С.Г. (2012) ;84(5):112-116, а метод спектрофотометричний. Приготування та аналіз кормової добавки (2.3.) не деталізовані. Загальний вміст альдегідів визначали за допомогою реагенту Purpald. Які саме реактивні альдегіди визначаються цим методом у зразках живих тканин, адже його застосовують для визначення формальдегіду у алкогольних напоях?
5. У Вступі зазначається: «.... участь альдегідів у формуванні реакційноздатних карбонільних сполук призводить до пошкодження β-клітин підшлункової залози» - напевно, у першу чергу, кровоносних судин.

б. Зауваження до термінів: С 31 «Продукти глікування протеїнів, які називаються кінцевими продуктами глікування (КПГ),» - коректніше перекласти «продукти прогресивного глікування» (AGEs – advanced...); С. 31 «окиснення форміату» - не форміату а метанало, форміат – це вже окиснена форма – кислота, крім того, не лише у назальній тканині, про що йдеться у роботі 30, але й у печінці, тощо, наприклад (Burgos-Barragan, *et al. Nature* 548, 549–554 (2017)). С 45 « гідразин виявляє основні властивості завдяки неспареним електронам атому азоту» (мається на увазі «неподіленим парам?»); С 107 - рівня низькомолекулярних відновлених SH- метаболітів (цистеїн, глутатіон, тіосульфат та ін.) – тіосульфат не є таким.

Встановлені недоліки не применшують наукової цінності репрезентованого обсягу наукової інформації, повністю відображеного у публікаціях високого наукового рівня.

Текст дисертації написано грамотною мовою, практично без стилістичних огріхів. Слід відзначити високу якість і коректність ілюстрацій як у дисертації, так і Авторефераті.

Висновок про відповідність

В цілому дисертація дисертація Крисюк Ірини Павлівни "Порушення та засоби корекції метаболізму альдегідів за умов розвитку патологій різного генезу" є завершеною роботою, яку відзначає охоплення різносторонніх експериментальних схем у вирішенні завдання оцінки ролі карбонільного стресу у розвитку патологій та способів його корекції. Дисертантка проявила високий рівень володіння експериментальними методами біохімії та молекулярної біології, ґрунтовні аналітичні здібності. Одержані результати відкривають нові можливості у корекції патологічних станів організмів. За актуальністю проблеми, методичними підходами, зробленими висновками, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів дисертація Крисюк Ірини Павлівни "Порушення та засоби корекції метаболізму альдегідів за умов розвитку патологій різного генезу" є

завершеною науковою працею і відповідає вимогам п.п. 9,11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ N 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016 р.), а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія.

Професор кафедри хімії
та методики її навчання
Тернопільського національного
педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка
доктор біологічних наук

10.09.2020 р.



О.Б. Столяр

