

Відзив офіційного опонента

на дисертаційну роботу Гачкової Галини Ярославівни

“Молекулярні основи антидіабетичної дії біологічно активних речовин,
виділених з лікарських рослин *Galega officinalis L.* та *Smallanthus
sonchifolius (Poepp. et Endl.) H. Robinson*”,

подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Актуальність теми

Пріоритетним завданням сучасної медицини є збереження здоров'я суспільства і профілактика захворювань. Однією з найважливіших проблем сучасної фармакотерапії є підвищення ефективності лікування цукрового діабету і максимально можливе зниження розвитку важких ускладнень, пов'язаних з слабким антидіабетичним впливом деяких синтетичних лікарських засобів, а також чисельними побічними ефектами, які їх супроводжують. Тому розробка і дослідження рослинних лікарських засобів для лікування цукрового діабету, набуває щораз більшої актуальності.

Враховуючи багатофакторність патогенезу цукрового діабету, доцільним та перспективним є застосування у комплексній терапії цього захворювання антидіабетичних препаратів на основі лікарських рослин, які б виявляли комплексний різноспрямований вплив на різні ланки патогенезу захворювання (знижували рівень глікемії, інсулінорезистентність, сприяли відновленню інсуліноутворюальної функції підшлункової залози та нівелювали шкідливі для організму прояви оксидативного стресу).

У дисертаційній роботі вирішується наукове завдання дослідження молекулярно-клітинних механізмів коригуючого впливу біологічно активних речовин *Galega officinalis L.* (козлятник лікарський) та *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (якон) на метаболічні, структурні і функціональні порушення клітин крові та підшлункової залози за умов експериментального цукрового діабету. Досліджено гіпоглікемічні, антиоксидантні та

імуномодулючі ефекти біологічно активних речовин, виділених з лікарських рослин *G. officinalis* та *S. sonchifolius* – потенційних джерел антидіабетичних фітопрепаратів. Метою даної роботи було з'ясувати молекулярно-клітинні механізми коригуючого впливу біологічно активних речовин *Galega officinalis* L. (козлятник лікарський) та *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (якон) на метаболічні, структурні і функціональні порушення при ЦД для обґрунтування їхнього застосування як засобів допоміжної терапії для зміцнення імунного статусу хворих на ЦД та розробки нових препаратів природного походження з антидіабетичною дією.

Виходячи з вищесказаного, вважаю, що тема дисертації Гачкової Г. Я. “Молекулярні основи антидіабетичної дії біологічно активних речовин, виділених з лікарських рослин *Galega officinalis* L. та *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson” є **актуальним науковим завданням**, має теоретичну і практичну цінність.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дослідження представлені у дисертаційній роботі є частиною науково-дослідної роботи кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка у рамках тем: “Розробка цукрознижуvalьних препаратів на основі біологічно активних речовин окремих лікарських рослин” (№ держреєстрації 0110U003147); “Молекулярні механізми антидіабетичної дії екстракту галеги лікарської” (№ держреєстрації 0110U003147); “Створення і дослідження біологічного впливу функціонального продукту харчування на основі фітопрепаратів, що мають антиоксидантну та цукрознижуvalьну дію” (№ держреєстрації 0116U001674); “Дослідження дії біологічно активних речовин природного походження з метою корекції патологій, що супроводжуються гіперглікемією” (№ держреєстрації 0116U001674), а також в рамках гранту від Державного фонду фундаментальних досліджень “Молекулярні механізми антидіабетичної дії препаратів рослинного походження” (№ держреєстрації 0113U005313) та за фінансової підтримки Західно-Українського центру біомедичних досліджень (West-Ukrainian BioMedical Research Center – WUBMRC) “The study of

molecular mechanisms of leukocytes structural and functional state changes under the conditions of experimental diabetes mellitus type 1 and its correction by admission of *Galega officinalis* extract".

Чомується номер держреєстрації теми "Розробка цукрознижуvalьних препаратів на основі біологічно активних речовин окремих лікарських рослин" (№ держреєстрації 0110U003147) збігається з таким номером для теми "Молекулярні механізми антидіабетичної дії екстракту галеги лікарської" (№ держреєстрації 0110U003147).

Наукова новизна досліджень та одержаних результатів

Загалом дисертаційне дослідження сприяє розумінню молекулярних механізмів, які лежать в основі протидіабетичної дії біологічно активних речовин, отриманих з *Galega officinalis* і *Smallanthus sonchifolius*, прокладаючи шлях для подальших дослідень і розробки нових протидіабетичних фітопрепаратів.

У ході виконання дисертаційної роботи вперше отримано фітопрепарати, стабілізовані за допомогою біогенних поверхнево активних речовин, які синтезуються штамом *Pseudomonas sp.* PS-17, а саме безалкалоїдний екстракт козлятника лікарського (*G. officinalis*) та суспензії порошку кореневих бульб якона (*S. sonchifolius*). Вперше показано, що введення безалкалоїдного екстракту козлятника лікарського призводить до підвищення концентрації інсуліну та С-пептиду у плазмі крові та виявляє цитопротекторний вплив на підшлункову залозу щурів за експериментальним цукровим діабетом.

Вперше підтверджено гіпоглікемічну дію суспензії на основі порошку кореневих бульб якона та її стабілізованої біосурфактантом PS-17 форми за умов цукрового діабету і показано вищу їхню здатність знижувати вміст глюкози і глікованого гемоглобіну, порівняно з водними екстрактами листя і кореневих бульб. Вперше показано, що фітопрепарати на основі безалкалоїдного екстракту козлятника лікарського та суспензії порошку кореневих бульб якона зменшують прояви оксидативно-нітративного стресу за умов *in vivo* на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету.

Вперше встановлено, що введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за умов ЕЦД виявляє коригуючий вплив на проіферативну активність клітин лімфоїдного і мієлоїдного рядів кісткового мозку, сприяючи відновленню пулу нейтрофілів кісткового мозку, зменшенню кількості лімфобластів і зумовлює пригнічення процесу апоптозу лейкоцитів. Вперше з'ясовано, що молекулярний механізм коригуючої здатності безалкалоїдного екстракту козлятника лікарського на міграційну здатність лейкоцитів реалізується шляхом перебудови елементів актинового цитоскелету та завдяки кількісному перерозподілу глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою вуглеводних детермінант.

Вперше показано, що застосування фітопрепаратів на основі якона та козлятника лікарського за умов ЕЦД підвищує ефективність неспецифічних механізмів захисту організму, що у комплексі з гіпоглікемічною дією може перешкоджати розвитку і прогресуванню ускладнень ЦД. Вперше показано, що БАР, наявні у досліджуваних фітопрепаратах якона і козлятника лікарського нормалізують співвідношення різновікових популяцій еритроцитів, виявляють мембраностабілізуючу дію та знижують агрегаційну здатність цих клітин, що є основою клітинного механізму сповільнення старіння еритроцитів периферичної крові.

Практичне значення одержаних результатів

Розроблено способи отримання седиментаційно стійких субстанцій на основі безалкалоїдної фракції екстракту козлятника та порошку кореневих бульб якона, які можуть слугувати основою антидіабетичних лікарських засобів та функціональних харчових продуктів. На розроблені способи отримання біологічно активних речовин з козлятника лікарського і якона та їхньої стабілізації за допомогою рамноліпідних біоПАР, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas* sp. PS-17, отримані Патенти України на корисну модель UA 96839, UA 101202 (2015).

Комплексні дослідження біологічних ефектів фітокомпонентів козлятника лікарського і якона на структурно-функціональний стан острівцевого апарату підшлункової залози та клітини крові щурів за умов цукрового діабету

підтверджують їхню виражену антидіабетичну дію. Застосування безалкалоїдного екстракту козлятника лікарського (у дозі 600 мг/кг) та екстрактів і суспензій кореневих бульб якона (у дозі 500 мг/кг) підвищує ефективність неспецифічних механізмів захисту організму, що у комплексі з гіпоглікемічною дією може перешкоджати розвитку і прогресуванню ускладнень цукрового діабету.

Поєднання гіпоглікемічного, антиоксидантного, імуномодулювального ефектів безалкалоїдного екстракту та екстрактів і суспензій якона, а також їхня здатність відновлювати і підтримувати функціональний стан β -клітин підшлункової залози та клітин крові за умов цукрового діабету свідчить про перспективність їхнього використання, як основи для створення фітопрепаратів з антидіабетичною дією.

Повнота викладу основних наукових положень та висновків у опублікованих наукових працях

Результати досліджень знайшли відображення у 61 науковій праці, серед яких 25 статей у фахових виданнях (6 – у міжнародних, 19 – у вітчизняних виданнях), з них 2 статі у виданнях, віднесені до першого і другого квартилів (*Q1 i Q2*) та 2 статті – у журналах четвертого квартилю (*Q4*) відповідно до класифікації Scimago Journal and Country Rank, 1 розділ монографії (у закордонному виданні), 2 патенти України на корисну модель, 33 тез доповідей у матеріалах конференцій і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел (311 найменувань). Дисертація викладена на 294 сторінках і проілюстрована 60 рисунками та 27 таблицями.

Робота побудована за традиційною схемою і складається з таких розділів, як “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали і методи досліджень”, “Результати

досліджень”, “Аналіз і узагальнення результатів досліджень”, “Висновки” та “Список використаних літературних джерел”.

Розділ “**Вступ**” написаний логічно, містить інформацію про актуальність роботи, мету і завдання, наукову новизну і практичне значення, зв'язок з науковими програмами, програмами, темами тощо.

У розділі “**Огляд літератури**” розглянуто сучасні уявлення про механізми, які залучені у розвитку дисфункції β-клітин підшлункової залози при ЦД, а саме висвітлено роль стресу ендоплазматичного ретикулуму, мітохондріальної дисфункції та оксидативно-нітративного стресу. Охарактеризовано роль лейкоцитів у етіопатогенезі цукрового діабету 1-го типу. Значну увагу приділено аналізу механізмів антидіабетичної дії біологічно активних речовин лікарських рослин, зокрема, *G. officinalis* та *S. sonchifolius*, як потенційних джерел фітокомпонентів з антидіабетичною дією. Розділ “**Огляд літератури**” дуже короткий як для докторської дисертації, включає всього 28 сторінок. Також не завжди є посилання на літературні джерела.

Розділ “**Матеріали і методи досліджень**” є дуже об’ємним і включає 37 пунктів, не враховуючи підпункти. Цей розділ містить досить широкий спектр використаних експериментальних підходів, які комплексно характеризують антидіабетичний ефект досліджуваних фітопрепаратів. На загал цей розділ добре написано і слугує серйозною основою для довіри до отриманих результатів.

У розділі “**Матеріали і методи досліджень**” відсутній метод визначення окисної модифікації протеїнів, який застосований у роботі. Також не завжди присутні назви фірми-виробника і країна походження для реагентів, зокрема наборів для імуноферментного аналізу.

Розділ “**Результати досліджень**” викладений у п’яти підрозділах на 100 сторінках, у яких представлені отримані результати. Розділ викладений у логічній послідовності, з належною повнотою, проілюстрований великою кількістю рисунків і таблиць, що значно полегшує сприйняття матеріалу. Кожен підрозділ присвячений певному блокові проблем, вирішення яких проілюстровано відповідними висновками. Проведене комплексне дослідження

гіпоглікемічного, антиоксидантного та імуномодулюючого ефектів, що дало змогу з'ясувати молекулярно-клітинні механізми коригуючого впливу біологічно активних речовин козлятника лікарського та якона на метаболічні, структурні і функціональні порушення при цукровому діабеті.

Розділ “Аналіз і узагальнення результатів досліджень” є доволі об’ємним (24 сторінки) і ключовим у дисертаційній роботі Гачкової Г. Я., написаний послідовно, а його зміст вдало підсумовує та узагальнює отримані результати. У цьому розділі авторка детально аналізує і обговорює результати власних досліджень, порівнюючи їх із існуючими даними літературних джерел, висловлює власні думки про молекулярно-клітинні механізми коригуючого впливу біологічно активних речовин, виділених з козлятника лікарського та якона за умов цукрового діабету та обґрунтують доцільність їхнього застосування при розробці нових ефективних антidiабетичних препаратів.

“Висновки” коректно і повністю відображають поставлені завдання. За результатами досліджень автором зроблено 8 висновків, які написані лаконічно, грамотно і випливають із отриманих результатів досліджень.

У “Списку використаних джерел” 311 посилань, з яких 296 – англійською мовою. Проте більшість посилань на роботи початку 2000-х років, і лише менше 20% публікацій за останні 5 років.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій. Сформульовані положення, висновки та рекомендації ґрунтуються на експериментальних даних, одержаних на основі достатньої кількості повторностей в експерименті, використанні адекватних методів дослідження та аналізу отриманих результатів. Інтерпретація результатів відповідає опублікованим у наукових фахових виданнях. Достовірність даних підтверджена статистичним аналізом.

Разом із загальною високою оцінкою рівня і науково-практичного значення дисертаційної роботи Гачкової Г. Я. у рамках наукової дискусії виникла низка запитань і редакційних зауважень.

Запитання:

1. Які молекулярні та клітинні механізми лежать в основі коригувального впливу біологічно активних речовин *Galega officinalis* і *Smallanthus sonchifolius* на метаболічні, структурні та функціональні порушення клітин крові та підшлункової залози при експериментальному діабеті?
2. Методом газової хромато-мас-спектрометрії визначено компонентний склад безалкалоїдного екстракту лікарської сировини. Виявлено, що екстракт містить сполуки з потенційними гіпоглікемічними, антиоксидантними та протизапальними властивостями. Які саме БАР у досліджуваних видах рослин виявляють за гіпоглікемічний ефект?
3. В огляді літератури варто було б проаналізувати наявні на фармацевтичному ринку антидіабетичні фітопрепарати і функціональні харчові продукти, і зокрема, на основі козлятника лікарського і якона.
4. Чи козлятник лікарський і якон є офіциальними лікарськими рослинами? Тобто чи дозволено офіційною медициною використання цих рослин чи екстрактів з них у лікарських засобах?
5. Для комплексної терапії якого типу цукрового діабету рекомендуються запропоновані фітопрепарати? Оскільки ЕЦД це діабет 1 типу, а синтетичні цукрознижуючі засоби застосовують переважно при діабеті 2 типу.
6. Для рекомендацій щодо подальшого терапевтичного використання фітопрепаратів важливо знати яка тривалість гіпоглікемічного ефекту у щурів за умов одноразового введення досліджуваних фітопрепаратів.
7. Не надано відомостей про потенційні побічні ефекти або токсичність *Galega officinalis*. Інформація про безпеку використання цього екстракту була б важливою. Які потенційні віддалені наслідки та міркування щодо безпеки використання цих біологічно активних речовин для протидіабетичних цілей?

Редакційні зауваження:

8. У розділі “Результати досліджень” у деяких таблицях (3.3, 3.5, 3.23, 3.27) середнє арифметичне значення і похибка середнього значення подані з різною точністю. Значущі цифри у середньому арифметичному та його похибці іноді зустрічаються різні. Зокрема, на ст. 130 у таблиці 3.3. наведені результати морфометричного дослідження підшлункової залози, де площа острівців представлена як $10440 \pm 358,5$ мкм. Те саме стосується і автореферату.
9. На сторінці 11 автореферату графік Б рисунка 4 аналогічний до графіку А, в той час як графік визначення рівня С-пептиду відсутній. На графіку В рисунка 4 відсутня група ЕЦД, тоді як наявні дві однакові групи ЕЦД+БФЕКЛ. При обговоренні цього рисунку (ст. 12 автореферату) констатовано, що концентрація інсуліну підвищувалася у групі з ЕЦД в 1,7 рази.
10. Варто було б додати перелік умовних скорочень і у автореферат дисертації, що полегшило б читання роботи. До переліку умовних скорочень можна було б додати ще декілька скорочень, які часто зустрічаються в тексті і не використовуються широким загалом, на відміну від ІЛ та БАР, які введені у цей перелік.
11. У дисертаційні роботі є низка граматичних і стилістичних помилок, наявні декілька повторів, є невідповідність шрифтів у тексті автореферату.

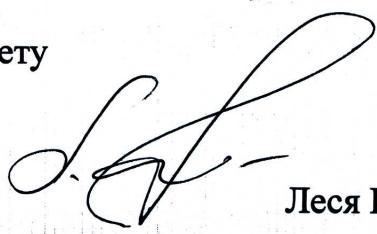
Всі зроблені зауваження не мають принципового характеру і тому не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Гачкової Галини Ярославівни “Молекулярні основи антидіабетичної дії біологічно активних речовин, виділених з лікарських рослин *Galega officinalis* L. та *Smallanthus sonchifolius* (Poerpp. et Endl.) H. Robinson”, подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія є завершеною науковою працею, має теоретичний науковий інтерес і

практичне значення та оформлена відповідно до вимог Міністерства і науки України № 40 від 12 січня 2017 року “Про затвердження вимог до оформлення дисертацій” та відповідає вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора біологічних наук, затвердженого постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 року № 1197, а її авторка Гачкова Галина Ярославівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Офіційний опонент
завідувачка кафедри біологічної хімії
Львівського національного університету
імені Данила Галицького
кандидат медичних наук,
доктор біологічних наук, професор



Леся КОБИЛІНСЬКА

