



ВІДГУК
офіційного опонента

на дисертацію Павлової Олександри Сергіївни
«Ключові протеїни обміну тіаміну та функціональний стан нервових клітин
за різної забезпеченості організму вітаміном В₁»,
подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність обраної теми, новизна та практична значимість результатів досліджень. Вітамін В₁ (тіамін) належить до нейротропних речовин, який вже тривалий час використовують при лікуванні неврологічних захворювань. Відомо, що вітамін В₁ має важливе значення у проміжному метаболізмі центральної та периферичної нервової системи. Але на сьогоднішній день досить не встановлені механізми між дефіцитом тіаміну та розвитком порушень, що відбуваються в нервових клітинах.

Тому з'ясування ролі тіамінзалежних процесів у гомеостазі нервових клітин є актуальним питанням, вирішення якого допоможе у пошуку шляхів лікування та профілактики нейродегенеративних захворювань.

З огляду на все сказане вище дисертаційна робота Павлової Олександри Сергіївни є своєчасною та актуальною, яка направлена на виявлення протеїнів, що є чутливими до зміни рівня забезпеченості організму тіаміном, будь то протеїни обміну вітаміну В₁, або протеїни цитоскелету в нервових клітинах.

Новизна дисертаційних досліджень полягає у проведенні комплексного дослідження змін у протеїнах, від яких залежить швидкість синтезу тіаміндифосфату у нервових клітинах, а саме, транспортера тіаміну (ТНТР-1) і тіамінпірофосфокінази за умов дефіциту вітаміну В₁ різної етіології. Також зроблений порівняльний аналіз окисно-відновного стану в тканині мозку за умов В₁-авітамінозу і В₁-гіповітамінозу та встановлено, що обмежене, але постійне надходження тіаміну попереджає розвиток окисного стресу. Продемо-

Продемонстровано підвищену чутливість астроцитів до дефіциту тіаміну різного ступеня (при обмеженому надходженні тіаміну знижується вміст гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) – маркеру функціонального стану астроцитів). Також при глибокому аліментарному авітамінозі у мозочку виявлені зміни рівня триплету нейрофіламентів. Введення вітаміну В₁ сприяло відновленню рівня триплету та частково астроцитарного маркеру, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку.

В роботі показана доцільність використання комбінації препаратів (висока доза вітаміну В₁ та препарат «Метовітан») для профілактики та/або лікування нейродегенеративних патологій, які індукуються або супроводжуються дефіцитом тіаміну.

Таким чином, отримані результати розширюють уявлення про біохімічні механізми залежних від забезпеченості клітин тіаміном змін у стані протеїнів нервових клітин, що беруть участь в обміні тіаміну (тіамінпірофосфокіназа та транспортер тіаміну), та окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету (гліальний фібрилярний кислий протеїн та триплет нейрофіламентів).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота виконана у 2014-2017 рр. в рамках наукових тем відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України:
1) «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (2012-2016 рр., тема № 4, державний реєстраційний номер 0112U002625), розділ 3 «Вивчення механізмів регуляції обміну та функціонування вітаміну В₁ та його похідних в нервових клітинах за нейродегенеративних патологій». 2) «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., тема № 15, державний реєстраційний номер 0112U002624), підрозділ 2 «Взаємодія систем регуляції вітамінами та коензимами внутрішньоклітинного метаболізму; вивчення фундаментальних основ процесів функціонування біологічних систем і регуляції вітамінами Е, В₁, РР, коензимами та їх біологічно активними похідними

внутрішньоклітинного метаболізму в нормі та за патології». Роботу було підтримано також програмою "FEBS Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe" (2017 р.) та стипендією за результатами конкурсу на кращу наукову роботу Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2015 та 2016 рр.).

Структура дисертації. Структура дисертаційної роботи класична. Основна частина складається зі вступу, огляду літератури, результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення та висновків. Робота містить також список використаних джерел із 250 найменувань. Дисертація викладена на 142 сторінках машинописного тексту (117 сторінок основної частини), результати подані у вигляді 34 рисунків та 2 таблиць.

На початку роботи наведена анотація українською та англійською мовами, де стисло подані отримані результати із зазначенням їх новизни. Наприкінці анотації містяться ключові слова та список публікацій здобувача за темою дисертації.

У «Вступі» згідно з вимогами, які ставляться до такого роду наукових робіт, подана загальна характеристика дисертації, а саме: обґрунтовується актуальність обраної тематики, вказаний зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, а також сформульовані мета і завдання досліджень; названі методи наукових досліджень із уточненням, що саме досліджувалось тими чи іншими методами. У «Вступі» також визначена наукова новизна отриманих результатів, їх практичне значення та особистий внесок здобувача із зазначенням кількості публікацій за матеріалами дисертаційної роботи та апробації результатів, а також вказана структура дисертації.

Розділ «Огляд літератури» викладений на 31 сторінці машинописного тексту, що складає 25% обсягу основної частини дисертації.

У даному розділі викладені сучасні відомості щодо основних біохімічних механізмів участі вітаміну В₁ у нормальному функціонуванні клітин та порушенні тіамін-залежних процесів за умов розвитку тіамін-дефіцитних станів. Обговорено можливі причини підвищеної чутливості нервової тканини до

нестачі тіаміну. Висвітлено сучасні уявлення щодо молекулярних механізмів дії вітаміну B₁ та проаналізовано його роль у розвитку нейродегенеративних процесів.

Розділ завершується підсумком щодо аналізу наукової літератури з досліджуваної проблеми та визначенням власного завдання у з'ясуванні молекулярних механізмів високої нейроактивності вітаміну B₁.

Розділ II «Матеріали та методи досліджень» містить інформацію про використані матеріали та реактиви, опис моделі експерименту та принципи методів експериментальних досліджень.

Серед методів – біохімічні (спектрофотометрія, флюориметрія) для оцінки загального вмісту протеїну, тіаміну у печінці, вмісту тіаміндіфосфату та активності тіамінірофосфокінази у мозку та оцінки параметрів окисно-відновного стану нервових клітин; імунохімічні (вестерн-блот аналіз, імуноцитота імуногістохімія): для оцінки вмісту протеїнів обміну тіаміну та нейроспецифічних протеїнів цитоскелету; молекулярно-генетичні методи (полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі): для визначення рівня експресії цільових генів; конфокальна мікроскопія: для встановлення локалізації цільових протеїнів та методи математичної статистики.

Розділ III «Результати досліджень та їх обговорення» містить чотири підрозділи.

У підрозділі 3.1. наведена загальна характеристика тваринних моделей дефіцитів тіаміну, які були використані в роботі.

У підрозділі 3.2. описані та обговорені результати досліджень транспортера тіаміну (THTR-1) за умов різної забезпеченості організму вітаміном B₁.

Підрозділ 3.3. стосується дослідження тіамінірофосфокінази за умов різної забезпеченості організму тіаміном та коригування вітамінідефіцитних станів.

Підрозділ 3.4. присвячений дослідженням нейроспецифічних протеїнів цитоскелету за умов різної забезпеченості організму тіаміном.

Після розділу «Результати досліджень та їх обговорення» дисертантом зроблені узагальнення та висновки.

У розділі «Узагальнення отриманих результатів» проведений інтегративний аналіз отриманих результатів із встановленням можливих причинно-наслідкових взаємозв'язків встановлених змін.

Автором наведено 8 висновків, які випливають із результатів проведених досліджень.

У списку використаних джерел 250 найменувань (247 найменувань – англomовні), з яких 34 за останні 5 років.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій. Сформульовані положення та висновки ґрунтуються на результатах, отриманих на основі достатньої кількості повторностей з використанням сучасних біохімічних, імунохімічних, молекулярно-генетичних та мікроскопічних методів досліджень. Достовірність даних підтверджена статистичним аналізом.

Повнота викладу основних результатів досліджень у наукових фахових виданнях. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць, з яких 7 наукових статей у фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого МОН України, 6 тез доповідей на Всеукраїнських та міжнародних наукових конгресах, конференціях та з'їздах.

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

Зауваження:

1. Розділ «Огляд літератури» перенасичений інформацією, складає 25% від основної частини дисертації та містить 7 підрозділів, кожен з яких має свої підпункти. Підрозділ 1.1. «Загальні відомості щодо тіаміну та його біологічно активних похідних» містить загальновідому інформацію, яку можна було не виносити у роботу.

2. У розділі «Матеріали та методи» немає інформації про використаний у дослідженнях препарат «Метовітан». Доцільно було дати його склад, фізико-хімічні властивості, біологічну дію тощо.

3. У розділі «Матеріали та методи» у підрозділі «Матеріали та обладнання» при перерахуванні використаного обладнання для спектрофотометра/флуорометра вказано для чого вони використовувались («вимірювання концентрацій протеїну та РНК»), при цьому всі інші прилади просто перераховані із зазначенням фірми та країни виробника.

4. 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.

5. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» на рисунках, що представлені у вигляді графіків, не позначені зірочкою достовірні зміни. Крім того ряд рисунків (3.11, 3.17, 3.21, 3.25, 3.28, 3.29), що складаються з декількох частин, дуже маленького розміру, що ускладнює сприйняття інформації.

6. У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» у підрозділі 3.4.1 «Актин за умов дефіциту тіаміну» немає обговорення отриманих результатів.

7. У роботі зустрічаються невдалі висловлювання, стилістичні та граматичні помилки, як наприклад, «епендорфи» замість мікропробірки, «вортекс» замість струшувач, «Метовітану» замість препарат “Метовітан”, «зміни були драматичними» тощо.

8. У висновках немає узагальнюючого висновку, який повинен формулюватись згідно поставленої в роботі мети дослідження.

9. У списку використаних джерел з 250 найменувань лише 34 за останні 5 років.

Запитання:

10. Чим обумовлений вибір у ваших дослідженнях таких відділів мозку як кора півкуль, гіпокамп та мозочок?

11. Чому у ваших дослідженнях окисно-антиоксидантний стан мозку ви оцінювали лише за рівнем АФК та SH-груп?

12. Чому для корекції патологічних змін ви використовували саме препарат “Метовітан”?

13. Чим обумовлений вибір термінів (21-й, 28-й та 35-й день) дослідження динаміки вмісту тіаміндифосфату та активності тіамінпірофосфокінази у відділах мозку при аліментарному гіповітамінозі?

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 Павлової Олександри Сергіївни «Ключові протеїни обміну тіаміну та функціональний стан нервових клітин за різної забезпеченості організму вітаміном В₁», подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є завершеною науковою працею, в якій отримано результати, що в сукупності вирішують поставлену проблему щодо комплексного дослідження стану протеїнів, від яких залежить швидкість синтезу тіаміндифосфату у нервових клітинах, а саме, транспортера тіаміну (ТНTR-1) і тіамінпірофосфокінази та маркерних протеїнів цитоскелету нервових клітин, за умов дефіциту тіаміну різної етіології.

Отримані результати доповнюють існуючі на сьогодні уявлення щодо ролі залежних від забезпеченості клітин тіаміном змін у стані протеїнів нервових клітин, що беруть участь в обміні тіаміну (тіамінпірофосфокіназа та транспортер тіаміну), та окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету (гліальний фібрилярний кислий протеїн та триплет нейрофіламентів).

На основі аналізу об'єкта дисертаційного дослідження, яким є протеїни метаболізму тіаміну нервової тканини, а саме, транспортер тіаміну, та тіамінпірофосфокіназа, та нейроспецифічні протеїни цитоскелету, 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 Павлової Олександри Сергіївни «Ключові протеїни обміну тіаміну та функціональний стан нервових клітин за різної забезпеченості організму вітаміном В₁» 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. Дворщенко

Заступник директора
з науково-педагогічної
роботи



М.А. Кошманчук