

1 6 ЖОВ 2018

Вх. №

71/03-07/18
М.К.

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Мазанової Анни Олександрівни на тему «Розробка імуноензимної тест-системи для визначення 25ОНD як маркера забезпеченості організму вітаміном D за цукрового діабету», подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія

Актуальність теми. Останні данні ВООЗ свідчать про те, що у всьому світі панує стійка пандемія дефіциту вітаміну D як серед дорослого, так і серед дитячого населення. На сьогоднішній день вітамін D в науковому світі розглядається як універсальний гормон, який через регуляторний вплив на експресію великої кількості генів, асоційованих з численними фізіологічними процесами в організмі, забезпечує нормальну життєдіяльність людини та достатній рівень здоров'я у всі періоди її життя - від зачаття до похилого віку. Зважаючи на це визначення ступеня забезпеченості організму людини вітаміном D набуває все більшої популярності у клінічній та лабораторній практиці не лише під час діагностики та лікування хворих з ураженням кістково-м'язової системи (оскільки низький вміст 25-гідроксिवітаміну D є одним з ключових маркерів для даної патології), а і у випадках хвороб, що не пов'язані з порушенням кісткового ремоделювання. До таких захворювань відносять серцево-судинні (гіпертонічна хвороба, інфаркт міокарда), онкологічні (рак передміхурової та молочної залоз, кишечника та інших органів) і автоімунні (ревматичні хвороби, цукровий діабет 1 типу, хвороба Крона та інші).

На світовому ринку представлено ряд тест-систем, які дозволяють визначати вміст 25ОНD у зразках сироватки та плазми крові. В основі такого визначення лежить або розділення метаболітів вітаміну D шляхом хроматографії з подальшим детектуванням мас-спектрометрією (HPLC/MS), або використання радіоактивних міток чи антитіл до 25-гідроксिवітаміну D (RIA та ELISA). Такі системи мають ряд недоліків, до яких можна віднести високу вартість, необхідність спеціального обладнання (хроматографічного блоку або радіаційного лічильника), небезпеку роботи з радіоактивними

елементами та необхідність спеціального навчання для персоналу лабораторій, що значно підвищує вартість визначення даного показника для кожного окремого пацієнта. Окрім цього, більшість цих систем не дозволяють проводити одночасне визначення у великій кількості біологічного матеріалу, що є доволі незручним для роботи персоналу діагностичних лабораторій.

Актуальність представленої дисертаційної роботи полягає у розробці вітчизняного діагностичного набору для швидкого визначення вмісту 25OHD у великій кількості зразків сироватки крові пацієнтів як з цукровим діабетом 1 типу, так і за умов розвитку інших патологій. Оскільки доведено зв'язок між низьким вітамін D-статусом організму та підвищенням ризику розвитку цукрового діабету, важливим є більш глибоке дослідження порушень ланок обміну та сигналювання вітаміну D на тлі даної патології, а також потенційної можливості корегування даного стану із застосуванням пролонгованої терапії холекальциферолом.

Враховуючи вищезазначене, актуальність дисертаційної роботи Мазанової А.О. не викликає сумніву, беручи до уваги важливість обраної проблеми, як складової частини сучасного наукового напрямку – молекулярної біотехнології.

Необхідно зазначити, що обраний напрям є продовженням і розвитком багаторічних наукових розробок з проблеми регуляції обміну й функціонування вітаміну D₃ у нормі й за патологічних станів в організмі, які традиційно проводяться у відділі біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом д.б.н., проф. Великого М.М. та к.б.н., пров. наук. співр. Апуховської Л.І.

Зазначимо, також що результати теоретичних досліджень з цієї проблеми постійно втілюються в практику охорони здоров'я населення, насамперед, здоров'я матері і дитини, шляхом спільних комплексних розробок Інституту біохімії НАН України з інститутами НАМН України, зокрема, ДУ «Інститут ПАГ ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України», які були розпочаті ще у другій половині ХХ століття та продовжуються до цього часу.

Дисертаційна робота відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки в галузях біотехнології та біохімії людини і тварин, що виконувалась згідно плану науково-дослідних робіт відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Дисертант особисто проводила експериментальні дослідження, обробку результатів, пошук та опрацювання даних наукової літератури. Аналіз та інтерпретація результатів досліджень проводились спільно з науковим керівником.

Обґрунтованість наукових положень дисертації, їх достовірність та новизна. Дисертаційна робота включає дві складові. Першу частину присвячено розробці та конструюванню імуноензимного діагностикуму для визначення вмісту 25-гідрокси вітаміну D у зразках сироватки крові людини і тварин. Значний експериментальний матеріал викладено у розділі власних досліджень, в якому поетапно описано синтез кон'югатів 25ОНD₃ з протеїнами-носіями, їх очищення та всебічну характеристику. У процесі виконання роботи Мазанової А.О. було проведено імунізацію кролів синтезованим кон'югатом 25ОНD₃-KLH та отримано поліклональні антитіла до 25ОНD, які підлягали подальшому очищенню та характеристиці методом непрямого імуноензимного аналізу. Продемонстровано, що антитіла здатні впізнавати 25ОНD у зразках сироватки крові за максимального розведення 1:10 000, що характеризує їх високу специфічність.

У виконанні даної роботи особливо важливим є етап конструювання імунодіагностикуму конкурентного типу для визначення 25ОНD у сироватці крові та проведення його валідування за рядом параметрів. Зокрема, автором проведено порівняння стандартної кривої, створеного імуноензимного діагностичного набору зі стандартною кривою комерційно доступного діагностикуму для визначення 25ОНD німецької компанії Immune Diagnostic System (25ОНD₃ EIA) і показано, що вони є майже ідентичними.

Дисертантом продемонстровано, що сконструйований тест-набір має високу специфічність, не є чутливим до наявності ряду інтерферуючих агентів у зразку та має низьку варіативність результатів і за чутливістю знаходиться на

рівні закордонних тест-систем. Він може успішно використовуватись для визначення рівня забезпеченості вітаміном D організму з високою точністю.

Другу частину дисертаційної роботи присвячено дослідженню біологічних основ порушень функціонування вітамін D-ендокринної системи за умов експериментального стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету I типу і можливості застосування холекальциферолу для корегування виявлених змін. На підставі результатів, отриманих за допомогою створеної автором імуноензимної тест-системи, встановлено, що розвиток цукрового діабету супроводжується дефіцитом вітаміну D в організмі тварин. Автором отримано важливі результати щодо особливостей функціонування вітамін D-ендокринної системи в нирках, печінці, кістковій тканині та кістковому мозку та показано різноспрямованість змін експресії 1- α -гідроксилази (CYP27B1) та рецептора вітаміну D (VDR) у цих тканинах. Показано, що дисбаланс складових вітамін D-ендокринної системи в кістковій тканині за умов цукрового діабету може бути причиною підвищеної резорбції кісток і, як наслідок, передумовою розвитку діабет-індукованого вторинного остеопорозу. Виявлено, що застосування вітаміну D₃ в дозі 600 МО протягом 30 днів чинило коригуючий, а, в деяких випадках, нормалізуючий вплив на синтез компонентів вітамін D-ендокринної системи в досліджуваних тканинах. Крім того, застосування холекальциферолу спричиняло незначне зниження рівнів глюкози в крові щурів з цукровим діабетом.

Науково-практична значимість роботи та конкретні шляхи використання результатів дослідження. Дисертаційна робота містить нові дані щодо особливостей метаболізму та сигналювання вітаміну D у ряді тканин організму за експериментального цукрового діабету I типу. Теоретичні положення, сформульовані під час аналізу отриманих результатів досліджень, стали основою розширення уявлень про вплив цукрового діабету на стан ренального та екстраренального гідроксилювання і сигналювання вітаміну D і уточнюють механізми розвитку остеопорозу та інших ускладнень при цукровому діабеті.

Робота має суттєве прикладне значення, адже розробка вітчизняного імуноензимного діагностикуму для визначення 25ОНD значно покращить перспективи швидкої та достовірної характеристики вітамін D-статусу широких верств населення. Виявлений в експерименті корегуючий вплив вітаміну D на стан вітамін D-ендокринної системи при цукровому діабеті 1 типу об'єктивно доводить ще раз доцільність профілактичного та лікувального застосування цього вітаміну у хворих з даною патологією.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій. Дисертаційна робота викладена на 141 сторінці (без списку літератури), ілюстрована 32 рисунками і 9 таблицями, включає традиційно необхідні розділи: анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їх обговорення, аналіз результатів і обговорення, висновки, список використаних джерел (всього 254 посилання) та перелік опублікованих праць за темою дисертації.

Дисертаційна робота написана грамотно, на високому науковому рівні, із залученням значної кількості оригінальних статей зарубіжних та вітчизняних авторів. Проаналізовані роботи провідних світових фахівців, які працюють в рамках даної проблеми.

Матеріал, викладений в дисертаційній роботі, відповідає меті та завданням досліджень, за змістом дисертація має завершений характер як самостійна науково-дослідна розробка.

Характеризуючи роботу в цілому необхідно відмітити, що вона виконана на світовому рівні і присвячена вирішенню актуальних питань медико-соціальної проблеми дефіциту вітаміну D у населення в умовах сучасного соціуму та кліматичних змін. Результати роботи мають не тільки теоретичне значення, вони спрямовані на впровадження новітніх технологій діагностики та лікування в практику вітчизняної медицини.

Дисертант добре володіє теоретичним та фактичним матеріалом, вдало сплановано експериментальне дослідження та підібрано адекватні сучасні методи вирішення поставлених задач. Обробку й статистичний аналіз

результатів здійснювали згідно відповідних методів з використанням комп'ютерного забезпечення.

Висновки, зроблені автором, є коректними і логічно узагальнюють проведені експериментальні дослідження. Достовірність висновків підтверджується даними статистичної обробки, наведеними в таблицях та рисунках і не викликає сумнівів.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Результати експериментальних досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи повною мірою висвітлені в 14 публікаціях, з них 7 – статті у провідних фахових виданнях, затверджених переліком ДАК України. Основні результати досліджень і теоретичні положення достатньо повно обговорені на наукових конференціях і семінарах (7 тез доповідей).

Зміст автореферату є ідентичним основним положенням дисертаційної роботи.

Зауваження та побажання до дисертації щодо її змісту і оформлення. Принципових зауважень стосовно змісту дисертаційної роботи, її викладення та автореферату немає. Автором отримані цікаві результати щодо відмінностей функціонування вітаміну D-ендокринної системи в нирках та екстраренальних тканинах при цукровому діабеті 1 типу. Під час викладення результатів дисертації по главам автор їх обговорює та порівнює з зарубіжними даними. Можливо доречним було б провести більш детальне обговорення цих даних також у розділі «Аналіз результатів і обговорення».

У вигляді дискусії хочу запропонувати автору під час публічного захисту дисертаційної роботи відповісти на наступні запитання:

1. Чи відомо Вам якою є на сьогодні ситуація зі станом забезпеченості вітаміном D дорослого та, що найважливіше, дитячого населення України?

2. Експериментальні дослідження були проведені з використанням наступної дози вітаміну D₃ - 600 МО D₃ на 1 кг маси тіла щура. Поясніть, чому саме така доза використовувались у Вашій роботі?

3. Чи вважає автор, що є необхідність у дослідженні рівнів різних активних метаболітів вітаміну D₃ за експериментального цукрового діабету 1 типу, зокрема, рівню 1,25-дигідрохолекальциферолу (1,25(OH)₂D₃)?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Мазанової Анни Олександрівни «Розробка імуноензимної тест-системи для визначення 25OHD як маркера забезпеченості організму вітаміном D за цукрового діабету», представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія, за методичним рівнем виконання, актуальністю, обсягом, науковою новизною одержаних результатів, теоретичним і практичним значенням, достатністю і повнотою викладеного матеріалу відповідає встановленим вимогам п. 11 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами згідно Постанови Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2013 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 657 від 27.07.2016 р.), до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 –біотехнологія.

Офіційний опонент:

Науковий керівник відділення хвороб сполучної тканини у дітей ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. акад.

О.М. Лук'янової НАМН України)
доктор медичних наук, професор,
Заслужений діяч науки і техніки України



Л.Омельченко
ОСОБИСТИЙ ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ:
Л.Омельченко
УЧЕНИЙ СЕКРЕТАР ІНСТИТУТУ