

1 7 ЖОВ 2018

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Мазанової Анни Олександрівни**

«Розробка імуноензимної тест-системи для визначення 25ОНD як маркера забезпеченості організму вітаміном D за цукрового діабету», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.20 – біотехнологія

Актуальність. Вітаміни групи D, до якої відносять холекальциферол (D₃), ергокальциферол (D₂) та ряд їх активних метаболітів, все частіше розглядаються не лише у контексті процесів регулювання кісткової цілісності, а і у якості потужних імуномодуляторних, проапоптичних, антиангіогенних, пролиферативних та антипроліферативних агентів. Такі плеiotропні ефекти вітаміну D викликають все більший інтерес у широкого кола науковців та клініцистів, оскільки протягом останніх десятиліть, у зв'язку зі змінами кліматичних умов та несприятливими екологічними факторами, у більшості населення світу констатують наявність дефіциту вітаміну D. З огляду на важливу роль вітаміну D у регулюванні життєво важливих процесів в організмі, низький рівень забезпеченості цим вітаміном розглядають як фактор розвитку багатьох хронічних захворювань людини, серед яких можна виділити захворювання серцево-судинної системи (інфаркт міокарда), онкотрансформації (рак молочної залози, 12-ти палої кишки та ін.) та автоімунні, зокрема і цукровий діабет 1 типу.

Хоча у світовій клінічній практиці визначення вмісту вітаміну D (а саме метаболіту 25ОНD, як маркера забезпеченості організму вітаміном D) увійшло до рутинних лабораторних аналізів, які призначають кожному пацієнту, в Україні ця практика не набула широкого розповсюдження більшою мірою через високу вартість процедури аналізу або взагалі відсутність тест-систем для визначення вітаміну D у клінічних лабораторіях.

Наявний на сьогоднішній день спектр методів для визначення 25ОНD у зразках пацієнтів має ряд недоліків, серед яких можна виділити: необхідність застосування спеціального дорогого устаткування (високоєфективна рідинна хроматографія, хроматографія у поєднанні з мас-спектрометрією); використання

нестабільних радіоактивних міток (RIA, радіо імунний аналіз); висока вартість реагентів (CLIA, хемілюмінесцентний аналіз). Враховуючи вищезазначене, найбільш зручним та безпечним на сьогодні вважають метод ELISA з використанням полі-, або моноклональних антитіл до 25ОНD. Хоча на світовому ринку на сьогоднішній день системи типу ELISA для визначення 25ОНD і є в наявності, проте вони мають занадто високу вартість для вітчизняних клінічних та наукових лабораторій, що є головною перешкодою для тестування вітамін D-статусу населення України.

Саме тому, дисертаційна робота Мазанової А.О., метою якої була розробка та конструювання вітчизняного імунодіагностикуму для визначення 25ОНD у сироватці крові, є **безумовно актуальною**.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Мазанової А.О. є продовженням багаторічних досліджень відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, які проводяться під керівництвом д.б.н., професора Великого М.М. в рамках розділу бюджетної теми № 4 «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (№ д/р 0112U002625, 2012-2016 рр.).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота Мазанової А.О. побудована за класичною схемою, вона складається з анотації, вступу, розділів «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», узагальнюючого розділу, висновків, переліку використаних джерел, який включає 254 посилання, та обов'язкового додатка у вигляді списку опублікованих праць за темою дисертаційної роботи. Роботу викладено на 165 сторінках машинописного тексту, проілюстровано 32 рисунками і 9 таблицями.

Вступ містить обґрунтування актуальності роботи, постановку мети та завдань, наведено об'єкт та предмет дослідження, сформульовано наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, підкреслено особистий внесок здобувача.

В розділі «Огляд літератури» розглянуто сучасні уявлення про біохімічні особливості обміну вітаміну D в організмі за низки патологій, зокрема цукрового

діабету 1 типу, а також проаналізовано наявні на сьогодні методи вимірювання 25OHD у зразках сироватки крові, зроблено їх всебічне порівняння та охарактеризовано етапи створення та валідування тест-системи типу ELISA. Мені дуже сподобалось, що дисертантка детально описала типову процедуру валідування біоаналітичних методів, на основі якої вона потім і виконувала роботу по перевірці методу.

Експериментальна робота Мазанової А.О. виконана із застосуванням сучасних хімічних, біохімічних, молекулярно-біологічних та біохімічних методів, які представлені у розділі «Матеріали та методи досліджень» і проаналізовано за допомогою коректних підходів математичної варіативної статистики. Це дає підставу стверджувати, що одержані експериментальні дані є достовірними та виконані на високому методичному рівні.

Рукопис викладено державною мовою з використанням фахової наукової термінології. Стиль викладу наукових положень, особисто отриманих результатів, висновків та узагальнень забезпечує в цілому їх позитивне сприйняття.

Науково-практична значимість роботи та конкретні шляхи використання результатів дослідження. Дисертантом самостійно розроблено та сконструйовано імуноензимну діагностичну систему для визначення метаболіту вітаміну D (25 гідрокси вітаміну D) у зразках сироватки крові людини і тварин. У процесі виконання роботи оптимізовано протокол синтезу кон'югату 25OHD₃ з гемоціаніном моллюска та овальбуміном, проведено синтез імунокон'югатів, їх очищення та характеристику методом тонкошарової хроматографії. Один з синтезованих кон'югатів було успішно використано для імунізації кролів, що дало змогу отримати високо специфічні поліклональні антитіла до вітаміну D, титр яких становив 1:10000 та зберігався після висолювання антитіл з сироватки крові імунізованої тварини.

У ході експериментальної роботи було підібрано оптимальні умови визначення вмісту 25OHD в серологічних зразках з використанням отриманих поліклональних антитіл та вперше сконструйовано вітчизняну ELISA-систему конкурентного типу для визначення 25OHD з біотин-стрептавідиновим

варіантом детектування специфічного сигналу. Для створеного набору було побудовано стандартну калібрувальну криву та проведено валідацію, в процесі якої доведено, що під час процедури проведення аналізу відсутній інтерферуючий ефект гемоглобіну, білірубину та триацилгліцеролів, відсоток перехресної реактивності системи з іншими метаболітами вітаміну D є несуттєвим та не вносить похибки до отриманих результатів, а варіативність визначення лежить у межах допустимих значень.

Новостворений тест-набір було використано для тестування ступеня забезпеченості вітаміном D організму тварин з експериментальним цукровим діабетом 1 типу та показано, що низький вітамін D-статус експериментальних щурів пов'язаний з порушенням синтезу компонентів вітамін D-ендокринної системи (рецептора вітаміну D, VDR; 1- α -гідроксилази вітаміну D, CYP27B1) у печінці, нирках та кістковій тканині. Дисертантом продемонстровано корегувальний вплив холекальциферолу у відновленні нормальної концентрації 25OHD в організмі експериментальних тварин, що сприяло частковому або повному відновленню синтезу VDR та CYP27B1 у досліджуваних тканинах.

Практичне значення проведених досліджень, перш за все, полягає у розробці вітчизняного імуноензимного тест-набору для визначення 25OHD у серологічних зразках, що відповідає усім вимогам до створення тест-систем такого зразка та може бути успішно використаний для визначення вітамін D-статусу організму людини і тварин як в нормі, так і за низки патологічних станів, зокрема цукрового діабету 1 типу.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Автореферат дисертаційної роботи є логічно побудованим, повністю відображає зміст та результати роботи, повністю відповідає вимогам щодо оформлення.

Результати роботи, які було отримано Мазановою А.О. під час виконання дисертаційної роботи, повною мірою є відображеними у 14 наукових публікаціях, з них 7 – статті у провідних закордонних та вітчизняних фахових виданнях. Окрім того, результати досліджень і теоретичні положення роботи

було представлено на вітчизняних та міжнародних профільних наукових конференціях, що відображено у 7 тезах доповідей.

Зауваження та побажання до дисертації щодо її змісту і оформлення.

Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. І дисертаційна робота, і автореферат написані логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту та технічного оформлення. Проте, до дисертанта є декілька запитань та зауважень.

- В огляді літератури відсутні висновки з логічним переходом до мети роботи та експериментальної частини.
- На деяких рисунках (Рис. 5 та 6 автореферату, рис.3.9 та 3.10 дисертації відсутні похибки).
- В тексті автореферату (стор.10) при описі Рис.6 переплутані вісі координат. В дисертації все добре. Також на цих рисунках не зрозуміло, які значення концентрацій на вісі X. На рисунках це від 0,01 до 1 нг/мл, а в тексті йдеться мова про діапазон від 1,25 до 150 нг/мл.
- При описі Рис.7а автореферату та Рис.3.11а дисертації автор зазначає, що концентрація гемоглобіну 0,07 г/л не викликає інгібування сигналу. По-перше, термін інгібування до сигналу не застосовується. Зменшення сигналу, а інгібування активності. А, по-друге, зменшення сигналу все ж таки відбувається, але невелике, приблизно 15 %.
- На стор.110 дисертації авторка дає посилання на Табл. 3.4, але це Табл. 3.5, яку краще було б розмістити після посилання, а не перед.

Зроблені зауваження стосуються, в основному, покращення викладу матеріалу, не носять принципового характеру, та не впливають на наукову значимість роботи.

В рамках наукової дискусії хотілося б отримати відповіді на наступні запитання:

- В роботі приводяться дані щодо концентрацій глюкози та 25OHD у щурів. А наскільки вони співвідносяться до концентрацій у людини?
- Відомо, що поліклональні антитіла у порівнянні з моноклональними володіють нижчою специфічністю до антигенів. Чому для конструювання

вашого імунодіагностикуму Ви вирішили використовувати саме поліклональні кролячі антитіла?

- Чому Вами був обраний конкурентний варіант детектування специфічного сигналу, а не «сендвіч» чи непрямий формат?
- Ви застосували свій набір для визначення ступеня забезпеченості вітаміном D організму тварин з цукровим діабетом 1 типу. Чому в такому разі Вами не проводилось тестування високих концентрацій глюкози, як потенційного інтерферуючого агента, на процедуру проведення аналізу?
- Чим пояснюється різнонаправленість змін компонентів вітамін D-ендокринної системи у нирках та печінці за умов експериментального цукрового діабету 1 типу?

Висновок про відповідність дисертаційної роботи встановленим вимогам. Дисертаційна робота «Розробка імуноензимної тест-системи для визначення 25ОНD як маркера забезпеченості організму вітаміном D за цукрового діабету», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія, є завершеним науковим дослідженням. Дисертанту вдалося повністю виконати всі поставлені завдання. За актуальністю, науковою новизною, обґрунтованістю висновків дисертаційна робота Мазанової Анни Олександрівни відповідає п. 12 «Положення про присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань» та вимогам ВАК України, а її автор, без сумніву, заслуговує на присудження ступеня кандидата біологічних наук.

Офіційний опонент:

Головний науковий співробітник
лабораторії біомолекулярної електроніки
Інституту молекулярної біології
та генетики НАН України
доктор біологічних наук, професор

Дзядевич С.В.

Підпис *Дзядевич С.В.*
посвідчується *Дзядевич С.В.*
Зав. маш. К. Мазанова