Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна
Національної академії наук України
3 - ЛЮТ 2021
Вх. № 110/03-07
НТР Карлова

ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук, професора Петрова Сергія Анатолійовича на дисертаційну роботу Меженської Ольги Олександрівни «НОВІ ПРОТЕЇНОВІ МІШЕНІ ДІЇ ТІАМІНУ І ЙОГО ПОХІДНИХ В НЕРВОВІЙ СИСТЕМІ» представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія

Актуальність обраної теми та зв'язок з науковими програмами.

Тіамін є одним із найбільш відомих вітамінів. Однак до семидесятих років минулого сторіччя панувала в науковому середовищі точка зору згідно з якою єдиною біологічно активною формою тіаміну є тіаміндифосфат, який є коферментом декількох десятків ферментів. За останні п'ятдесят років накопичилися наукові факти, які свідчать про неможливість пояснити певні ефекти тіаміна його коферментною функцією. Були встановлені такі біологічно активні метаболічні форми тіаміну як тіамінтрифосфат і аденезинтіамінтрифосфат, 4 – метил - 5β – оксиетилтіазол, тіохром і інші.

Хоча дослідження біологічних функцій цих сполук проводяться уже приблизно п'ятдесят років до остаточного рішення цієї проблеми ще досить далеко.

Окреме місце займає проблема функціонування тіамін зв'язуючи білків. Ці дослідження розпочаті і активно проводяться в відділі біохімії вітамінів і коензимів інституту біохімії НАН України. Робота Меженської О. О. виконана саме в цьому напрямку.

Робота Меженської О. О. є певним внеском у цей науковий напрямок, що і визначає високий рівень іі актуальності.

Робота виконана в межах плану наукових досліджень відділу біохімії вітамінів і коензимів інституту біохімії імені О. В. Паладіна НАН України, зокрема вона зв'язана з темою. «Роль вітамінів А, Е, B_1, РР, $Д_3$, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (№ держреєстрації 0112U002625 у 2012 – 2016 роках) та теми «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних меж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (№ держреєстрації 0112U002625 у 2012 – 2016 роках).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації, та їх достовірність.

Достовірність результатів дисертаційної роботи Меженської О. О. ґрунтується на документальності проведених в роботі досліджень. Зокрема в роботі приведені профілі елюції, електрофореграми, первинні результати біоінформативних аналізів тощо.

Достатньою мірою для кандидатських дисертацій охарактеризований так званий «тіамінзв'язуючий білок». Детально проведений аналіз його компонентів. Автор проявив наукову доброчесність і об'єктивність відмітивши окремі результати роботи для пояснення яких потрібні додаткові дослідження.

Окремо слід відмітити обґрунтованість наукових положень і проміжних висновків. Зокрема, в ряді досліджень автор отримані в експерименті результати перевіряв застосовуючи біоінформативний комп'ютерний аналіз.

Отже достовірність отриманих дисертантом результатів не викликає сумнівів, оскільки підтверджена достатньою кількістю експериментальних і біоінформативних досліджень, використанням сучасних високоінформативних методів дослідження і базується на аналогічних результатах, одержаних в інституті біохімії НАН України і за кордоном.

Висновки базуються на отриманих дисертантом результатах і не викликають заперечень.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи.

Автором вперше доведена специфічність зв'язування з тіаміном протеїнів, які проявляють малатдегідрогеназну , глутаматдегідрогеназну і тіамінфосфатгідролізну активність. Встановлені ізоферменти малатдегідрогенази, які здатні зв'язуватися з тіаміном. Використання ряду сучасних методів дослідження дозволили автору визначити варіанти протеїнів, що можуть бути складовими тіамінзв'язуючого білка, які є частиною кластера нікотинового ацетилхолінового рецептора. Автором за допомогою молекулярного докінга вдалося встановити можливі сайти зв'язування тіаміну тіамінзв'язуючим білком і залишки амінокислот, які приймають в цьому участь.

Практичне значення отриманих результатів.

Оскільки такі поширені нейродегенеративні захворювання як хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера та деякі інші пов'язані з порушеннями обміну тіаміну в нервовій системі отримані автором результати мають бути використані при лікуванні цих хвороб.

Крім того результати дисертації Меженської О. О. використовуються при проведені занять з курсу «Біохімія» в Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця.

Повне відображення основних результатів у наукових фахових виданнях.

Результати дисертаційної роботи Меженської О. О. опубліковані в 10 наукових статтях, опублікованих в вітчизняних і зарубіжних журналах і 10 в тезах міжнародних і вітчизняних симпозіумах і конференціях.

В цих публікаціях в достатній мірі відображені матеріали дисертації.

Загальна характеристика роботи.

Дисертація містить такі розділи: анотація, зміст, список використаних скорочень, вступ, огляд літератури, який складається з двох глав, матеріали та методи досліджень, результати та їх обговорення, узагальнення, висновки, список використаних джерел та трьох додатків.

Дисертація викладена на 230 сторінках друкованого тексту. В роботі є 15 таблиць та 37 рисунків. Список використаних джерел налічує 362 найменування.

В «огляді літератури» представлені результати досліджень біологічних властивостей тіаміну та його природних і синтетичних біологічно активних похідних. Досить детально розглянуті сучасні уявлення відносно механізмів участі тіаміну в діяльності нервової системи в нормі і за умов розвитку нейродегенеративних захворювань.

Крім того наведені результати досліджень процесів зв'язування тіаміну з тіамінзв'язуючими білками. Приведені дані різних авторів щодо особливостей зв'язування тіаміну і роль таких білковотіамінових утворень в транспортуванні тіаміну та реалізації окремих його функцій.

В цілому можна констатувати, що цей розділ дисертації Меженської О. О. свідчить про те, що вона ознайомилась з сучасним станом досліджуваної проблеми і достатньо повно відобразила це в «Огляді літератури».

Достатньо детально описані матеріали та методи досліджень. Матеріали, які здобувач використовувала для досліджень, описані в достатній мірі. Реактиви приведені з назвою фірм, які їх виробляють. Зокрема в цьому розділі значне місце займає опис синтезу афінного сорбента, приєднання спейсера і послідовність операцій за умов афінної хроматографії.

Також детально описаний протокол електрофоретичних досліджень. Позитивною рисою дисертації є та обставина, що дисертант спів ставляв результати окремих експериментів з комп'ютерними біоінформативними дослідженнями.

Взагалі слід виділити широкий спектр експериментальних і біоінформативних методів, застосованих дисертантом.

Найбільш інформативним є розділ, присвячений результатом дослідження і їх обговоренню.

На початку досліджень дисертант вивчала наявність малатдегідрогеназної та глутаматдегідрогеназної активностей в мозку щурів. Це дослідження не тільки дало позитивну відповіль на це питання, але й продемонструвало здатність тіаміну зв'язуватись з досліджуваними ферментами. Цей результат був підтверджений експериментом з застосуванням масспектрометрії в Німеччині. Також серед протеїнів , з якими був здатен зв'язуватися тіамін був протеїн з ТДФазною активністю.

Важливо, що дисертант знайшов в тіаміновому елюаті білки з цілою низкою різних активностей. Цей важливий факт, нажаль, дисертант детально не проаналізував, хоча він відкриває широку перспективу для досліджень цілого спектру ферментів, активність яких може регулюватися тіаміном і його катаболітами.

Далі дисертант зосередив свою увагу на регуляції малатдегідрогенази і глутаматдегідрогенази тіаміном і тіаміндифосфатом, хоча важливо було б дослідити інші метаболіти тіаміну в цьому плані.

В цьому розділі слід відмітити певне протиріччя між результатами дослідів по впливу тіаміну на активність вище вказаних ферментів в дослідах in vivo і in vitro.

Оскільки комерційний препарат малатдегідрогенази, який був у розпоряджені дисертанта був гетерогенним, автор припустив,що в ньому присутні ізоформи цього ферменту. Тому наступним етапом досліджень було визначення конкретних ізоформ МДГ, здатних зв'язувати тіамін. За допомогою двовимірного електрофорезу з подальшим МС – аналізом автору вдалося встановити дві мітохондріальні ізоформи малатдегідрогенази і одну цитозальну форму, здатні зв'язувати тіамін:

За допомогою гель – фільтрації автор зробив спробу охарактеризувати молекулярні маси тіамінзв'язуючого протеїна. Ці дослідження підтвердили, що тіамінзв'язуючий протеїн не є індивідуальним білком, а представляє собою надмолекулярний комплекс з субодиничною структурою. Аналіз структури цього комплексу після ряду експериментів, довів що він містить два протеїна: Agrin і LRP4, хоча в комплексі очевидно присутні і інші протеїни кластеру нікотинового ацетилхолінового рецептора.

Слід зазначити, що масспектрометричний аналіз не дає точну відповідь про присутність тих чи інших протеїнів, а демонструє лише вірогідність такої присутності. Тому дисертант вирішила перевірити ці результати за допомогою Вестернблот аналізу. Цей метод підтвердив попередні результати. Зокрема було встановлено, що протеїни Agrin і LRP4 є складовими препарату тіамінзв'язуючого протеїна. Також було показано, що вміст цих протеїнів в тканинах мозку істотно зменшується при експериментальному гіповітамінозі тіаміну. Введення тваринам високих доз тіаміну повністю відновлює вміст LRP4 і частково відновлює вміст Agrin.

Цей останній факт безумовно заслуговує більшої уваги, оскільки механізм індукції вітаміном синтезу протеїнів як правило не обмежується індукцією синтеза одного білка, а призводить до так званого каскадного синтезу.

Заключна частина експериментального розділу дисертації Меженської О. О. присвячена біоінформативному аналізу результатів.

З метою визначити сайти зв'язування тіаміну з тіамінзв'язуючими білками автор застосував метод молекулярного докінгу. Автор також спробував визначити амінокислотні залишки відповідних поліпептидних ланцюгів, що відповідають за зв'язування тіаміну.

Ця частина роботи виконувалась, щоб підтвердити, що тіамінзв'язуючим комплексом є саме комплекс Agrin - LRP4. Для визначення специфічності

такого зв'язування автор провела докінг зв'язування ацетилхоліну з комплексом Agrin і LRP4. Експериментальний результат щодо більш низької спорідненості ацетилхоліну то тіамінзв'язуючого комплексу в порівняні з тіаміном по відношенню до комплексу Agrin - LRP4 був підтверджений біоінформативним аналізом з використання методів комп'ютерної біології.

Автор встановив за допомогою комп'ютерних програм подібність сайту зв'язування тіаміну з білками комплексу Agrin - LRP4 до сайтів зв'язування тіаміндифосфату з мультиензимним піруватдегідрогеназним комплексом. Докінг комплексу Agrin - LRP4 з фосфатними ефірами тіаміну показав різницю в зв'язуванні та пояснив причини більш низької афінності фосфатів тіаміну у порівнянні з тіаміном.

Важливим фактом, встановленим дисертантом є постійне супроводження малатдегідрогеназної активності тіамінфосфатгідролазною активністю. На основі молекулярного докінгу автор зробив припущення, що роль тіаміну і тіаміндифосфату у функціонуванні ацетилхолінового рецептора полягає в стабілізації комплексу Agrin - LRP4 в процесі реконструкції і функціонування нікотинового ацетилхолінового рецептора. Крім того автор вважає що ацетилхоліновий рецептор можна розглядати як канал вивільнення з нервових клітин тіаміну в нефосфорильованому стані, оскільки відомо, що при збудженні нервово – м'язових волокон в навколишнє середовище разом з ацетилхоліном вивільняється і тіамін.

Заключення написано логічно і не викликає зауважень. Висновки конкретні і витікають із отриманих автором результатів.

Зауваження до роботи:

1. Предмет дослідження сформульований не конкретно.
2. Чому в більшості досліджень автор обмежився тільки трьома повторами. Ця кількість недостатня для отримання об'єктивних даних.
3. При порівнянні таблиць 4.2.3. и 4.2.4 при однакових умовах експерименту отримані абсолютно різні дані. Як це пояснити?
4. Автор не приводить логічного пояснення чому тіамін і тіаміндифосфат в мітохондріях інгібують глутаматдегідрогеназу, а при застосовуванні фермента, асоціьованого з носієм спостерігається протилежний ефект?
5. Автор зосередив увагу на можливості ролі тіаміну і ТДФ в стабілізації нікотинового ацетилхоліного рецептора. Але з нашої

точки зору обмежувати роль тіаміна у його похідних у нервовій системі тільки стабілізацією ацетилхолінового рецептора некоректно.

6. Термін «Тіамінзв'язуючий протеїн» виходячи з отриманих автором результатів не слід було вживати, оскільки як показав автор здатність зв'язувати тіамін є у декількох протеїнів.
7. 4 і 5 висновки слід було б об'єднати, а 6 висновок розділити на два.

Ці зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертації Меженської О. О.

Висновок

Дисертаційна робота Меженської Ольги Олександрівни «Нові протеїнові мішені дії тіаміну і його похідних в нервовій тканині» є завершеною самостійною роботою з актуальної проблеми вітамінології, в якій отримані нові дані, що мають наукову і певну практичну цінність і в сукупності містять вирішення наукового завдання дослідження нових тіамін зв'язуючи протеїнів.

За своєю актуальністю, новизною, теоретичним та практичним значенням, об'єктом проведених досліджень та повнотою вкладу в опублікованих працях дисертаційна робота повністю відповідає вимогам пп 9 та 11 «Порядку присудження наукових ступенів» затвердженого постановою кабінету міністрів України № 567 від 24.07.2013 року зі змінами, винесеними згідно з постановою кабінету міністрів України № 656 від 19.08.2015 року, а її автор Меженська Ольга Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Завідувач кафедри біохімії
Одеського національного університету
ім. І. І. Мечникова
доктор біологічних наук, професор С. А. Петров

Підпис Петрова С.А. засвідчую
Вчений секретар
Одеського національного університету
ім. І. І. Мечникова
доцент С. В. Курандо

25.01.2021р