

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Савчук Олени Іванівни на тему: "Участь протеасомного протеолізу в ішемічному ушкодженні мозку", представлену до офіційного захисту в спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Актуальність теми дисертації. За даними ВООЗ частота інсультів у різних країнах світу коливається від 1,5 до 7,4 випадків на 1000 населення. В Україні мозковий інсульт вражає щорічно понад 100 тисяч осіб, серед яких біля 80 % приходить на його ішемічні форми. Ішемічний інсульт, як і інші цереброваскулярні захворювання, належить до групи мультифакторних хвороб, розвиток яких зумовлений складною взаємодією генетичних факторів і факторів зовнішнього середовища. Серед генетичних чинників, що можуть мати важливу роль у патогенезі ішемічного інсульту, важливе значення належить поліморфним варіантам певних генів (їх сьогодні описано біля 100), серед яких, безумовно, й гени що кодують субодиниці протеасоми.

Роль протеасомного протеолізу у розвитку серцево-судинних хвороб є сьогодні одним із перспективних напрямів досліджень. Встановлено, що протеасомний протеоліз внутрішньоклітинних білків має важливе значення у регуляції процесів атерогенезу – обміні ліпопротеїдів, експресії молекул клітинної адгезії, апоптозі гладеньком'язових та ендотеліальних клітин. Порушення протеасомного протеолізу призводить до накопичення внутрішньоклітинних білків та загибелі нейронів.

Незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених патогенезу ішемічного інсульту, молекулярні зміни, які відбуваються у тканинах мозку за умов ішемії-реперфузії, а також роль генетичних чинників у ініціації та розвитку ішемічного ушкодження мозку, залишаються вивченими недостатньо. Крім того, вивчення частоти алельних варіантів генів, що кодують субодиниці конституційної та імунопротеасом (PSMA6 та LMP2) в українській популяції раніше не проводилося. Інформація про механізми фенотипової реалізації поліморфних варіантів цих генів може бути важливою у розв'язанні питання про значення різних чинників у розвитку ішемічного інсульту.

З огляду на це, дисертаційна робота Савчук О.І., присвячена вирішенню питання про роль протеасомного протеолізу в ішемічному інсульті, є своєчасним та актуальним дослідженням, а отримані результати та висновки є вагоми для розвитку сучасної фізіології, патофізіології та неврології.

Наукова новизна, теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження.

Важливим позитивним аспектом дослідження Савчук О.І. є комплексний підхід у визначенні участі протеасомного протеолізу в процесах ішемічного ушкодження головного мозку.

Наукова новизна проведеної роботи полягає в тому, що автором вперше виміряно всі три види протеолітичної активності протеасоми (трипсиноподібна, хімотрипсиноподібна та пептидглютамілпептидгідролазна) у нервовій тканині щурів і визначено їх зміни за умов моделювання ішемічного інсульту. Вперше проведено комплексні дослідження нервових клітин кори та стріатума головного мозку на світлооптичному та електронно-мікроскопічному рівнях з вивченням динаміки їх структурних змін після фокальної церебральної ішемії у щурів. Вперше виявлено кореляцію між змінами протеасомної активності та поведінковою активністю тварин у динаміці розвитку ішемічного інсульту. Крім того, вперше досліджено частоту алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці конституційної та імунпротеасом, у хворих на ішемічний інсульт в українській популяції.

Усі вперше отримані дані дозволяють стверджувати, що протеасомний протеоліз відіграє суттєву роль у патогенезі ішемічного ушкодження мозку.

Теоретичне значення роботи полягає в тому, що дані отримані в ній за експериментальних умов при відтворенні патогенного впливу відкривають можливості для подальшого вивчення протеасомного протеолізу в розвитку ушкодження головного мозку та його ролі в ішемічному інсульті. Крім того, в ході даної роботи удосконалена й відпрацьована методика моделювання фокальної церебральної ішемії у щурів, яка може застосовуватися у науковій роботі іншими науковцями.

Практичне значення отриманих результатів про роль алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці конституційної та імунпротеасом, у патогенезі ішемічного інсульту дозволяють оцінювати ризик виникнення гострого ішемічного

інсульту, диференційовано підходити до його терапії з урахуванням генотипу хворого, оцінювати ризик виникнення ускладнень захворювання. Крім того, генотипування осіб за алельними варіантами гена, що кодує субодоміну конституючої протеасоми PSMA6 може бути використано для скринінгу хворих на ішемічний інсульт та його ранньої діагностики.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота Савчук О.І. є ґрунтовним, цілісним дослідженням. Завдання дослідження цілком відповідають поставленій меті. Побудова та організація роботи логічні та послідовні. Сформульовані О.І. Савчук наукові положення, узагальнення та висновки базуються на достатній кількості спостережень: 63-х щури лінії Wistar, 102 хворих на ішемічний інсульт та 92 особи контрольної групи. У дослідженнях застосовані сучасні об'єктивні методики, які є адекватними поставленим завданням, а саме експериментальна модель фокальної церебральної ішемії шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії, поведінкові тести, світлова та електронна мікроскопія, спектрофлуориметрія та полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі. Їх вибір є достатнім та інформативним для вирішення поставлених завдань і дозволив вирішити поставлені задачі на сучасному методичному рівні, що дало можливість автору отримати вірогідні результати та зробити обґрунтовані висновки.

Достовірність наукових положень захищено аналітичними методами статистики. Аналіз та статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням програмного забезпечення: ImageJ, Excel, Origin 8.0, SPSS ver. 22.0, 7500 Fast Real-Time PCR System Software. Кореляційний аналіз був проведений за допомогою статистичного пакету SPSS (ver. 22.0). Зв'язок між кількісними показниками оцінювався за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона. Для порівняльної оцінки результатів моніторингу неврологічних функцій та з метою встановлення достовірності різниці показників між порівнюваними групами та підгрупами використовували однофакторний дисперсійний аналіз. Статистичну значущість результатів молекулярно-генетичних досліджень оцінювали за критерієм χ^2 . Для створення прогностичної моделі ризику виникнення інсульту була використана бінарна логістична регресія. Результати виконаного статистичного

аналізу підкріплюються 24 рисунками (графіками і мікрофотографіями) і 6 таблицями.

Висновки логічні, впливають з матеріалів дослідження, чітко сформульовані, конкретні, відповідають поставленим завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патології» в рамках цільової академічної програми «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболіка в системній біології» (2012-2016рр.)» (№ держреєстрації 0112U001475).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота оформлена згідно вимог ДАК МОН України (Наказ МОН України від 12.01.2017 р. №40) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів роботи, висновків і списку літератури, що налічує 192 бібліографічних описи (10% кирилицею, 90% – латиницею). Мова дисертації – українська. Текст дисертації викладено та оформлено дисертантом якісно, що заслуговує позитивної оцінки. Загальний обсяг роботи 130 сторінок комп'ютерного машинопису (основний текст – 99 сторінок).

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, серед яких 7 статей у наукових фахових виданнях, що входять до затвердженого переліку ДАК України, 7 тез доповідей – у матеріалах наукових конференцій, у тому числі і міжнародного рівня. Сукупність усіх публікацій у повній мірі відображає викладені в дисертації результати дослідження. Зміст анотації є ідентичним основним положенням дисертації. Автореферат дисертації за змістом та формою відповідає вимогам ДАК України і повністю відображає основний зміст дисертації.

Дискусійні питання та зауваження.

Позитивно оцінюючи роботу Савчук О.І. в цілому, слід зазначити, що у процесі рецензування роботи виникла низка зауважень.

1. Вивчаючи активність протеасоми у зоні ураження, автор чітко не визначила, що у дослідженні виступало в якості контролю.

2. В авторефераті дисертації одним із значень виконаної роботи, автор констатує факт про те, що відпрацьована методика моделювання фокальної церебральної ішемії у щурів, що може застосовуватися у науковій роботі. У розділі «Матеріали і методи дослідження» автор пише про те, що використовувалась методика J. Koizumi et al. Як так розумію, методика Koizumi була вдосконалена і в удосконаленому вигляді має певні переваги. Про модифікації методики треба було зазначити у роботі, і якщо ці модифікації суттєві, можливо, їх треба було б запатентувати?

3. Інформацію, наведену у висновку 3, необхідно було подати більш коректно. По-перше, зміни активностей протеасоми у гомогенаті тканини ще не свідчать про переважання типу протеасоми у клітинах. Для такого твердження слід було б провести додаткові дослідження - визначити експресію генів субодиниць протеасоми та провести блотинг з визначенням білка відповідних субодиниць. По-друге, безпідставно вважати, що протягом 6 та 24 годин зміниться кількість різних протеасом у клітинах, чи навіть просто їх співвідношення. Тим більше, в роботі визначалися зміни загальної активності певного виду, а не типи протеасом.

4. Автор провів дуже ґрунтовний аналіз літературних джерел, результатів власних досліджень, тому логічним і доцільним завершенням роботи, на мою думку, мала стати схема участі протеасомного протеолізу в ішемічному пошкодженні мозку. Це б значно прикрасило роботу і підкреслило науковий рівень дисертанта.

5. У роботі використано досить багато застарілих літературних джерел - лише 11% літератури за останні 10 років. Враховуючи актуальність питання, що вивчалось, необхідно було орієнтуватися на більш сучасні дослідження.

Хотілося б почути відповіді дисертанта на наступні запитання

1. Чи можна стверджувати, що в нейронах міститься і конституційна і імунопроотеасома?
2. Поведінкові тести є необхідною складовою доклінічних досліджень на експериментальних моделях ішемічного інсульту. Чим обумовлений вибір саме тестів «Відкрите поле» та «Липка стрічка»?
3. Вами вперше було визначено частоту алельних варіантів генів, що кодують субодиниці протеасоми (LMP2 та PSMA6), у хворих на ішемічний інсульт та у практично здорових осіб в українській популяції. Як узгоджуються отримані Вами результати з результатами досліджень інших авторів, можливо в інших популяціях?

Висловлені зауваження і запитання не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Савчук Олени Іванівни на тему: "Участь протеасомного протеолізу в ішемічному ушкодженні мозку", що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин є завершеною науково-дослідною роботою, яка містить нові науково обґрунтовані результати, щодо ролі протеасомного протеолізу у розвитку ішемічного інсульту, що має важливе значення для сучасної фізіології, патофізіології та неврології. За актуальністю теми, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням одержаних результатів дисертація повністю відповідає вимогам п. 11 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами та доповненнями, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015 і №567 від 27.07.2016), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент,
професор кафедри фізіології і патофізіології
з курсом медичної біології Сумського
державного університету, завідувач
наукової лабораторії молекулярно-
генетичних досліджень,
доктор біологічних наук, професор

В.Ю. Гарбузова

В.Ю. Гарбузова

