

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, завідувача кафедри
біологічної хімії Харківського національного медичного університету
МОЗ України, професора Наконечної Оксани Анатоліївни

на дисертаційну роботу

МОХАММАД АЛІ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАІ

**«ВІК-ЗАЛЕЖНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОЯВУ ГОРМЕЗИСУ ДО ІОНІВ
МІДІ»,**

що подана до захисту у спеціалізовану вчену раду К 64.051.17
Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна МОН України
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

1. Актуальність теми дисертації.

Дисертаційна робота Мохаммад Алі Юсеф Аль Бегаі присвячена вивченню ролі мідь - зв'язувальних білків у механізмах індукованої резистентності до іонів міді, зв'язку гормезису з активністю про- та антиоксидантної системи, а також можливого взаємозв'язку між індукованою резистентністю та ймовірністю виникнення фіброзу печінки.

Протягом останніх десятиріч спостерігається значне збільшення людей похилого віку, так зараз на Землі живе близько 705 млн. людей, кому за 65. Тому старіння населення є однією з глобальних проблем сучасного світу.

Деякі автори розглядають старіння як фізіологічний процес організму, пов'язаний з порушенням регуляторних механізмів, зокрема у похилих людей спостерігається зниження адаптаційних процесів у відповідь на вплив екзогенних та ендогенних негативних факторів, що сприяє розвитку захворювань і настання смерті. Тому одним з актуальних питань геронтології є чому у похилих людей спостерігається порушення систем регуляції адаптаційних процесів?

Серед населення у віці 70 років та старше 82% постійно вживають ліки. Тому актуальним питанням геріатричної фармакології є також застосування лікарських препаратів у людей похилого віку. В США від передозування медичних препаратів щороку помирає 300 тис. похилих людей. До клінічні випробування нових лікарських препаратів фармацевтичними фірмами проводять на молодих

тваринах, не враховуючи дозо залежність, фармакодинаміку та фармакокінетику лікарських препаратів у старих тварин.

На сучасному рівні розвитку науки практично не досліджені механізми гормезису, проте для їх дослідження необхідно зрозуміти ефект малих та надмалих доз дії ксенобіотиків. У теперішній час запропоновано декілька гіпотез, які намагаються пояснити радіаційний ефект надмалих доз, який разом з ефектом гормезису мають спільні механізми.

В останні роки все більшу увагу вчених привертає питання збільшення тривалості життя населення, зокрема застосування калорійно обмеженої дієти (КОД), що також може мати гормезисну природу. Тому дослідження можливих механізмів збільшення тривалості життя при застосуванні КОД з позиції гормезису може бути перспективним напрямом в медицині.

У сучасній літературі бракує інформації щодо ролі мідь-зв'язувальних білків у зв'язуванні іонів міді та їхнього розподілу в клітинах печінки.

Таким чином, встановлення нових вік-залежних особливостей проявів гормезису до ксенобіотиків, зокрема іонів міді, є актуальним завданням біохімії та геронтології і його вирішення дозволить збільшити тривалість життя.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

3. Наукова новизна одержаних результатів та їх теоретичне значення.

Дисертаційна робота має безсумнівну наукову новизну та теоретичне значення. Зокрема, автором вперше показано, що попереднє введення щурам відносно малих доз сірчаноокислої міді індукує резистентність у цих тварин до летальних доз цього токсиканту. Ступінь резистентності залежить від кількості попередніх малих доз, а також від віку тварин. Гормезисний ефект до сірчаноокислої міді зберігався не менше 45 днів після останнього введення малої дози та мав U - подібний характер і залежав від кількості попередніх введень малих доз токсиканту. Автор наголошує, що ефект індукованої резистентності досягав найбільшого прояву після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді, після чого поступово зменшувався, а після шести послідовних введень з

інтервалом 48 годин, ефект індукованої резистентності був відсутнім.

Автором вперше показано, що вік-залежний характер визначається специфічними мідь-зв'язувальними білками печінки, що впливають на характер розподілу іонів міді в гепатоцитах. Автором показано, що старі тварини не поступаються молодим здатністю адаптуватися до токсичних концентрацій сірчаноокислої міді та мають іншу стратегію адаптації. На початкових стадіях формування гормезису проявлявся окидативний стрес на тлі збереження функцій печінки.

Дисертантом вперше показано, що при прояві гормезису до сірчаноокислої міді при збереженні функціональної активності печінки мав місце розвиток фіброзу. Слід відзначити, що автором на моделі циклічного режиму годування тварин показано, що в першому циклі втрати маси тіла мало місце дворазове збільшення вмісту гідроперекисей ліпідів в мітохондріях печінки, підвищення активності ферментів АОС, зокрема глутатіонпероксидази. У наступних циклах втрати маси тіла визначені показники змінювалися незначно.

Автором вперше показано, що на початкових стадіях розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки мало місце пригнічення активності клітинної ланки імунітету організму.

4. Найбільш суттєві результати, одержані особисто здобувачем.

Дисертаційне дослідження є самостійною науковою працею, про що свідчить особистий внесок автора в її виконання. Автором особисто обрано тему, мету та завдання роботи, проведений патентний пошук та аналіз літератури, статистично опрацьовані результати дослідження, оформлено дисертацію. Автором самостійно виконані експериментальні дослідження з визначення біохімічних, імунологічних та фізіологічних показників, проведені статистичні розрахунки, оформленні тези та написані статті, написані та оформлені розділи дисертації.

Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно зі науковим керівником д.б.н., проф. Божковим А. І. Дисертаційна робота виконана у відділі біофізики мембран та відділі молекулярної біології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

5. Ступінь обґрунтованості та достовірності одержаних результатів, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційна робота Мохаммад Алі Юсеф Аль Бегаї є закінченим науковим дослідженням, яке виконано на сучасному методичному рівні. Сформульовані автором основні положення, висновки і рекомендації зроблені на підставі результатів, отриманих у дослідженнях на великій кількості дослідного матеріалу, науково обґрунтовані та логічно витікають із результатів досліджень.

Автором використано чотири серії експериментів для визначення часу збереження гормезису. Дисертаційна робота виконана із застосуванням сучасних адекватних, необхідних для вирішення поставленої мети та завдань дослідження, методів: біохімічних (визначення активності ензимів та концентрацій метаболітів), хроматографічних та електрофоретичних - для характеристики мідь-зв'язувальних білків, метод диференціального центрифугування, мікроскопічних (визначення фагоцитарної активності нейтрофілів), фізіологічних, статистичних.

Надані таблиці, рисунки переконливі, висновки конкретні і повністю підтверджуються результатами досліджень.

Експериментальна робота проведена у відповідності до основних положень біотичних норм під час проведення досліджень, регламентованими міжнародними та вітчизняними документами: Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Директивами Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що засвідчено біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 3 від 23 березня 2017 р.).

Дослідження проведені на базі віварію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Основні біохімічні дослідження проведені на базі Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Результати роботи задокументовані цифровими даними, статистично

опрацьовані з використанням параметричних та непараметричних методів статистики за допомогою програми Microsoft Excel та програмного пакета Statistica 6.

Результати досліджень представлені у 5 таблицях та 23 рисунках, аналіз яких викладено у тексті дисертації. За результатами досліджень сформульовані 7 висновків, які за змістом відповідають меті та 6 завданням роботи.

Таким чином, наукові положення і висновки, сформульовані автором в дисертаційній роботі, обґрунтовані та базуються на результатах власних досліджень і за суттю відповідають їм.

6. Практичне значення одержаних результатів дослідження.

Результати, одержані автором, поглиблюють сучасні уявлення про роль мідь-зв'язувальних білків у механізмах індукованої резистентності до іонів міді, зв'язку гормезису з активністю про- та антиоксидантної системи.

Автором було розроблено модель індукованої резистентності до токсичних сполук, яка може буде використана у дослідженнях при вивченні вік-залежної відповіді на багаторазовий екзогенний вплив, та й у фармакологічних роботах. Також ця модель може буде використана у практичній медицині при вивченні й розробці засобу лікування захворювання Коновалова-Вільсона. Результати дослідження впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці лабораторних робіт з дисциплін «Біохімія» та «Біотехнологія» для студентів біологічного факультету, які навчаються за освітньо-професійною програмою «Біологія» на першому (бакалаврському) рівні освіти, а також при розробці програм нормативних дисциплін «Молекулярна біологія» та «Біотехнологія».

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях та авторефераті.

Аналіз дисертаційної роботи та автореферату свідчить, що використано власні наукові публікації, у тому числі, написані у співавторстві. В кожній науковій праці, опублікованій у співавторстві, чітко зазначений внесок дисертанта. За результатами дослідження опубліковано 8 наукових праць, серед

яких 6 статей у зарубіжних наукових фахових виданнях і 2 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

8. Апробація результатів дисертації.

Основні результати дисертації були представлені на науково-практичних конференціях: XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017); науково-практична конференція «Здоров'я, харчування, довголіття» присвячена 85 - річчю від дня народження проф. Ю. Г. Григорова (Київ, 2016).

9. Обсяг та структура дисертації.

Дисертаційна робота Мохаммад Алі Юсеф Аль Бегаї складається зі вступу, аналітичного огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, розділу результатів власних досліджень та обговорення, висновків, списку використаних літературних джерел та додатків.

Загальний обсяг дисертаційної роботи - 146 сторінок друкованого тексту; робота ілюстрована 5 таблицями та 23 рисунками, включає 211 джерел літератури (30 кирилицею, 181 латиницею).

Оформлення та структура представленої дисертації в цілому відповідають чинним вимогам до кандидатських дисертацій. Дисертація та автореферат викладені українською мовою, стиль описання результатів досліджень, наукових положень та висновків забезпечує доступність сприйняття роботи. Зміст автореферату відповідає змісту дисертації, у стислій формі повно відображує основні положення та висновки роботи. Технічне оформлення дисертації та автореферату якісне.

У **вступі** автором обґрунтовано актуальність дослідження, визначено предмет, об'єкт і мету дослідження, сформульовані завдання, охарактеризовано методи дослідження, розкрито суть наукової новизни дослідження, практичне та теоретичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, викладено дані щодо апробації та висвітлення матеріалів дослідження у фахових виданнях.

У розділі 1 «Вік-залежні особливості формування резистентності до іонів важких металів і роль вільно-радикальних процесів в цьому» автор проводить аналіз сучасної наукової літератури за напрямом дисертаційної роботи, розкриває роль вільних радикалів у механізмах старіння, роль гормезису у механізмах вік-залежної адаптації, прояв гормезису до іонів важких металів, роль металопротеїнів у механізмах стійкості до іонів важких металів та у регуляції оксидантно - антиоксидантної системи. Автором критично проведено науковий аналіз ролі калорійно обмеженої дієти в уповільненні процесів старіння.

У розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» правильно визначено програму дослідження, обґрунтовано вибір та напрямок дослідження. Розроблена здобувачем програма досліджень та вибраний методичний інструментарій забезпечили вирішення поставлених завдань та досягнення мети роботи.

У розділі 3 «Результати та їх обговорення» виявлено залежність прояву гормезису до іонів міді від схеми попереднього введення малих доз ксенобіотику та роль мідь-зв'язувальних білків.

Автор досліджує залежність прояву гормезису від кількості попередніх введень та від тимчасового інтервалу між введеннями малих та летальних доз сірчаноокислої міді. Також в цьому розділі досліджується біохімічні та імунологічні наслідки гормезису до сірчаноокислої міді. Визначається динаміка маси тіла і порівнюється рухова активність молодих та старих тварин. Автор характеризує морфологічні зміни в печінці після 3-х введень сірчаноокислої міді. Досліджуються показники про - та антиоксидантної системи, клітинного та гуморального імунітету у молодих та старих тварин при введеннях сірчаноокислої міді. Показано зміни досліджуваних показників у щурів при циклічному режимі годуванні.

Аналіз дисертаційної роботи за допомогою доступних програм для перевірки тесту на унікальність, StrikePlagiat (<https://panel.plagiat.pl/web/main/printReport.html>) засвідчив унікальність тексту: дисертація - КП1-13,46%, КП2-3,28%, автореферат – КП1-10,5%, КП2-3,4%.

10. Відповідність дисертації визначеній спеціальності.

За змістом, одержаними результатами та висновками дисертація відповідає паспорту спеціальності 03.00.04- біохімія (біологічні науки).

11. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

Суттєвих зауважень щодо оформлення дисертаційної роботи немає. Структура та зміст автореферату ідентичні тим, що наведені в дисертації.

Позитивно оцінюючи дисертацію у цілому, слід зазначити, що в процесі рецензування роботи виникли деякі зауваження, запитання або дискусійні моменти.

Недоліки автореферату щодо змісту і оформлення: у тексті зустрічаються орфографічні та технічні помилки: стор. 1 – «вільно-радикальних гіпотеза» (вільно-радикальна гіпотеза), «три введень» (три введення) (стор.6); В тексті автореферату зустрічаються стилістичні помилки: «з однієї тієї частки лопаті» (стор.5), разом написані слова; немає ком в реченнях, де потрібно (стор.5); Стилiстично неправильно складені речення: «Металотіонеїни, які вперше були виділені в 1957 році, їх роль в різних функціях клітини активно досліджується» (стор.5); «Мав місце розвиток фібротичних змін в печінці, тобто розвиток фіброзу» (стор.3)- повтор зрозумілих речей. Некоректні формулювання: «Фіброз печінки, який проявлявся втратою маси тіла, зниженні температури тіла, втраті працездатності...» (стор.10).

Дуже суперечливе ствердження, що «фіброз печінки належить до вік-залежних патологій» (стор.1), фіброз печінки також може розвиватися у дітей та у молодих людей після впливу різноманітних токсичних та інфекційних факторів, зокрема після перенесеного гепатиту С. Не згодна з визначенням об'єкту та предмету дослідження.

У матеріалах та методах дослідження: автор не вказує, в якому біологічному об'єкті визначає активність ферментів, вміст гаптоглобіну, церулоплазміну та інших показників.

Рисунки: рис.2- підпис до рисунку: після введення сірчаноокислої міді з розрахунку на 1 г печінки, то як Ви розраховували масу печінки у живих тварин?

Рис.3- Кількість тварин в експериментальних групах (5-6), який метод статистики Ви використовували у своєму дослідженні? Рис.6 – різні підписи до рисунку: вміст колагену, а по осі ординат - вміст оксипроліну; відношення маси печінки до маси тварин у відсотках не відповідає цифровим значенням (стор.10); рис. 9,11- не повні одиниці визначення вмісту гідроперекисей ліпідів;

Таблиця 1 – не визначена кількість тварин в кожній підгрупі, не всюди визначена вірогідність, а також немає значень кількості іонів міді у старих тварин при схемі введення: перше введення 1+1+1 на 100г.

Навіщо було дублювати назви рисунків під рисунком та по ординаті (рис.3);

Недоліки дисертації щодо змісту і оформлення:

У тексті дисертації зустрічаються орфографічні, стилістичні, технічні помилки: паттерни (стор.5); «свободнірадікальні процеси» (стор.26), мідь не є «з'єднанням», а є біогенним елементом, «фагоцитальна клітина» (стор.91), «есенціальний» (стор.35), «придушуватися» (стор.40); некоректні фрази: «постфізіологічні процеси». Неповний список скорочень;

В завданнях дослідження: завдання 5 – молекули середньої молекулярної маси більш свідчать про процеси ендогенної інтоксикації, а не стан імунної системи, є більш значущі показники для характеристики стану імунної системи;

В об'єкті дослідження – повинно бути відображено тему дисертації: вік-залежний характер, особливості прояву гормезису...;

В предметі дослідження: мідь-зв'язувальні білки, активність ферментів, гідроперекисі ліпідів

Чи було необхідним розбивати 1 главу на 8 підрозділів (один підрозділ складає 1-2 сторінки) та 2 главу на достатню кількість підрозділів.

Недостатньо відображена у «матеріалах та методах дослідження» статистична обробка отриманих результатів, загальна кількість тварин та кількість тварин в експериментальних групах, спостерігається параметричний чи непараметричний розподіл?

В розділі «Матеріали та методи дослідження», підрозділі 2.3.3 –виділення мітохондрій з гепатоцитів більш правильне, ніж з печінки. Не всюди є посилки на список джерел (стор.29, 33);

Немає одиниць вимірювання біохімічних показників в таблицях: табл.3.3 (стор.89), табл.3.4 (стор.91). Ряд зауважень і пропозицій були обговорені з дисертантом, були взяті до уваги та опрацьовані.

Поряд з цим виникло ряд питань, які мають дискусійний характер і не впливають на загальний позитивний погляд на дисертаційну роботу.

1. При проведенні декапітації експериментальних тварин використовували ефірний наркоз. Чи коректно це з точки зору біоетики?

2. З отриманих експериментальних даних відомо, що введення ксенобіотиків старим тваринам необхідно розраховувати не на одиницю маси тіла, а на одиницю маси печінки. Як Ви будете розраховувати необхідну дозу у живих тварин?

3. На Вашу думку, чи правильне ствердження, що процеси фіброзу в печінці підтверджує незмінний вміст альбуміну, холестеролу, триацилгліцеролів, креатину, активність АсАт та АлАТ в сироватці крові?

4. У матеріалах та методах дослідження не вказано загальна кількість тварин. Скільки щурів Ви використали для отримання власних результатів? Які методи статистики Ви використовували в Ваших дослідженнях?

5. Що стосується кількості тварин в експериментальних групах: чому в одному випадку у Вас було 5 тварин, в іншому 6, 7, 8,10 щурів?

6. З отриманих Вами експериментальних даних відомо, що за умов введення сірчаної міді спостерігається зниження температури на 0,8-1,5°C. Як Ви можете це пояснити?

7. В практичному значенні отриманих результатів Ви пишете, що Ваша модель може бути використана у практичній медицині при вивченні й розробці засобу лікування хвороби Коновалова-Вільсона? Поясніть, яким чином?

8. «Визначання активності аконітази показало, що вона сильно змінюється у відповідь на втрату і відновлення маси тіла і між її активністю і вмістом ГПЛ немає кореляційних зв'язків». Чи проводили Ви кореляційний аналіз? Як Ви можете пояснити зміни активності ферменту ЦТК зі змінами маси тіла експериментальних тварин?

Варто помітити, що виявлені зауваження не мають принципового значення й не зменшують наукові цінності рецензованої дисертації.

У цілому ж наукові положення, висновки й рекомендації, які сформульовані в дисертаційній роботі, слід вважати такими, що цілком відповідають меті та завданням дослідження.

12. Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Мохаммад Алі Юсеф Аль Бегаї «ВІК-ЗАЛЕЖНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОЯВУ ГОРМЕЗИСУ ДО ІОНІВ МІДІ» є самостійним, завершеним науковим дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове розв'язання важливого наукового завдання.

За актуальністю, об'ємом, використаними методами дослідження, новизною отриманих результатів, можливістю їх практичного використання, коректністю та достовірністю зроблених висновків в цілому відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. (із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016р.) до кандидатських дисертацій, а її автор Мохаммад Алі Юсеф Аль Бегаї заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 –біохімія.

Офіційний опонент
завідувач кафедри біологічної хімії
Харківського національного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор



Наконечна О.А.