

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертаційну роботу Мохаммада Моршед Аїед Алсардія «Дослідження
механізмів «відновлення» певних біохімічних показників біологічно
активними спорлуками після дії токсичних доз іонів міді», що
представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук наук за спеціальністю
03.00.04 – біохімія

1. Актуальність теми. Вивчення механізмів регуляції біологічних процесів в організмі залишається одним із головних завдань сучасної біохімії. Збереження сталості метаболізму в організмі лежить в основі життєдіяльності і функціонування біологічних систем. Напроти, тривалі та стійкі зміни гомеостатичних показників, як правило, приводять до розвитку патологічних станів. Пошук способів регуляції метаболічних порушень і гомеостазу в цілому є актуальним завданням сучасної біологічної науки. Багаточисельні дослідження молекулярних механізмів патогенезу багатьох захворювань свідчать про ключову роль порушень окисно-відновних процесів в клітині, рівноваги редокс-систем та розвитку часто окислювального стресу. Проте, все ще залишається не з'ясованим до кінця, чи є окислювальний стрес причиною або наслідком розвитку патології і старіння організму.

Як відомо, іони важких металів, зокрема іони міді – одні з найбільш поширених токсичних сполук зовнішнього середовища. Збільшення вмісту іонів міді в організмі супроводжується порушенням метаболізму і розвитком патологічних станів. Проте остаточно не вирішено питання щодо прооксидантних властивостей іонів міді.

Тому метою роботи стало з'ясування впливу міді на деякі показники про-антиоксидантної системи, біохімічні та фізіологічні характеристики організму експериментальних тварин. Важливим та актуальним в даному дисертаційному дослідженні є те, що дисертантом експериментально обґрунтовано доцільність та ефективність застосування біологічно активних добавок для «відновлення»

певних біохімічних показників на тлі інтоксикації організму іонами міді та при старінні організму.

2. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота Мохаммада Моршед Айед Алсардіа є комплексним науковим дослідженням і виконана на сучасному науковому рівні із залученням адекватних методів дослідження: біохімічних, фізіологічних, препаративних, аналітичних, електорофоретичних, статистичних. В експерименті використано достатню кількість лабораторних тварин. Фактичний матеріал ілюстрований таблицями і рисунками. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи базуються на методичних принципах, що відповідають меті і поставленим завданням, є експериментально обґрунтованими та логічно витікають із отриманих результатів.

3. Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що дисертантом уперше доведено, що досліджувані біологічно активні добавки під назвою «мікс-фактор» і низькомолекулярні компоненти молозива – НМК, які отримані з біологічних об'єктів – різних видів грибів та молозива, мають здатність усувати окислювальний стрес, індукований дією іонів міді, або, що виникає внаслідок старіння організму. Прояв окисного стресу супроводжувався втратою маси тіла, зниженням температури тіла, зменшенням кількості еритроцитів і зниженням здатності тваринами здійснювати роботу.

Вперше показано, що превентивний прийом «мікс-фактора» (насьогодні вважається головним трендом в медицині розвинених країн) забезпечує усунення ефектів інтоксикації організму сірчаноокислою міддю у великих дозах.

Низькомолекулярні компоненти молозива за визначенням деяких показників здатні виявляти як антиоксидантні властивості (при низьких концентраціях 0,05-0,1 мг/100 г маси тіла), так і прооксидантні – при високих концентраціях (більше 1 мг/100 г), тобто чинити регулюючий вплив на функціонування редокс - системи організму.

Вперше показано, що досліджувані біологічно активні добавки «відновлюють» фізіологічні показники організму тварин та біохімічні показники функціональної активності печінки при Cu-індукованому фіброзі.

Встановлено, що при тривалому прийомі «мікс-фактора» тваринами на пізніх етапах онтогенезу (30-33 міс) спостерігалася нормалізація показників про-антиоксидантної системи (зокрема, вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондріях печінки і сироватці крові, активність антиоксидантних ферментів), збільшувалась тривалість життя, здатність здійснювати роботу, що може розцінюватись проявом геропротекторних властивостей досліджуваного об'єкту.

На основі проведеного комплексного дослідження показано наявність взаємозв'язку між показниками про-антиоксидантної системи та фізичною активністю організму.

4. Практичне значення роботи. Дисертаційна робота Мохаммада Моршед Аїед Алсардіа має виражений фундаментальний характер і обгрунтовану коректну практичну спрямованість. Отримані результати мають важливе значення для біохімії, медицини, фармакології. Отримані результатами експериментальних досліджень показали, що біологічно активні добавки «мікс-фактор» (виготовлений за ТУУ 10.08-33206207-002:2018) та низькомолекулярні компоненти молозива приймають участь в регуляції метаболізму в організмі, зокрема, редокс-систем; виявляють гепатотропну дію у щирів з Cu-індукованим фіброзом; можуть бути використані в якості перспективних антидотів при токсичних отруєннях, наприклад, іонами міді; а також як геропротектори. Низькомолекулярні компоненти молозива і «мікс-фактор» можуть бути перспективними речовинами в розробці природних систем регуляції активності печінки при запальних і фібротичних змінах.

Отримані результати впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна та враховані при виконанні експериментальних робіт в НДІ біології.

5. Повнота викладення наукових положень, висновків і рекомендацій в опублікованих працях. Наукові положення дисертації повною мірою викладені в опублікованих дисертантом роботах. Опубліковано 6 статей – у зарубіжних спеціалізованих виданнях (серед них 1 стаття у виданні, яке входить до науко-метричної бази Scopus) та 2 тез доповідей у збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних конференцій. Результати досліджень і основні наукові положення, викладені в опублікованих працях, ідентичні тим, що наведені в дисертації. Структура дисертації є традиційною і складається з анотації, змісту, вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 196 джерел (з них – 81 кирилицею та 115 латиницею). Використані літературні джерела переважно за останні 5-10 років. Робота проілюстрована 27 рисунками та 5 таблицями. Анотація по дисертаційній роботі оформлена згідно з вимогами наказу №40 від 12 січня 2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Автореферат відповідає структурі та змісту дисертації.

У *вступі* розкрито актуальність проблеми, обґрунтовано необхідність проведення даного дослідження, сформульовано його мету та завдання, визначено новизну та практичне значення, задекларовано особистий внесок здобувача, наведено інформацію про впровадження результатів і їх висвітлення у друкованих працях.

У *першому розділі* (літературний огляд) є 3 підрозділи, де викладено огляд літератури про сучасні уявлення щодо ролі іонів важких металів у запальних процесах (не зовсім зрозуміло, чому обрані запальні процеси), характеристика метаболізму ксенобіотиків в організмі (теж відомі та вивчені процеси), роль іонів міді в організмі в формуванні патологічних тсанів та актуальні питання стосовно можливих механізмів захисту клітин при оксидативному стресі.

Слід відмітити, що дисертант Мохаммад Моршед Аїед Алсардіа, подає матеріали літературного огляду з позицій фахового науковця, творчо, критично, з порівняльною оцінкою і переконливо доводить, що проблема дисертаційної

роботи не розкрита, наукові та практичні аспекти за результатами роботи можуть бути практично впроваджені. Завершено огляд літератури коротким висновком.

У Розділі 2 «**Матеріали та методи дослідження**» представлено об'єкти та предмети дослідження, етапи та умови експерименту, характеристика методів, які були використані дисертантом для досягнення поставленої мети.

Використано велику кількість різних методів. Зокрема, виконано моделювання Си-індукованого токсикозу у щурів, окремо модель для оцінки дії «мікс-фактора» і комплексу низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива на показники гомеостазу; препаративні методи - одержання сироватки крові та еритроцитів, мітохондрій з клітин печінки, мікросомальної та цитозольної фракцій; гістологічні дослідження. Аналітичними методами визначалась активність багатьох ферментів (10): аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, глутатіонпероксидази, малатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази, аконітатгідратази, гамма-глутамілтрансферази, вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондріях і фракціях, при спонтанному та аскорбатіндукованому ПОЛ, вміст альбуміну, концентрацію креатиніну, холестеролу, триацилгліцеролів.

В наступних розділах автор послідовно викладає результати проведених досліджень, систематизує матеріал та проводить науковий аналіз отриманих даних.

Так, у *Розділі 3 (підрозділ 3.1)* викладено результати визначення параметрів соматичних та біохімічних показників у тварин з Си-індукованим токсикозом. Біохімічні показники, що характеризують функціональний стан печінки: активність АСТ, АЛТ, концентрація холестеролу, креатиніну, альбуміну, триацилгліцеролів вірогідно не змінювались у порівнянні з контрольною групою тварин. Встановлено збільшення активності ферменту ГГТ на 263%. Оскільки найбільш чутливою та швидкореагуючою на різноманітні зміни в клітині, є редокс-система, то були визначені такі показники як вміст гідроперекисів та активність глутатіонпероксидази, зміна

яких може свідчити про розвиток окиснювального стресу в клітинах печінки. Загалом, отримані результати свідчать про початкові стадії дисфункції печінки на тлі гострого токсикозу, викликаного іонами міді. З літературних джерел також відомо, що іони міді накопичуються переважно в клітинах печінки, спричиняють пригнічення її функцій та розвиток початкових стадій фіброзу.

Наступна серія експериментів (*підрозділ 3.2*) була присвячена визначенню антитоксичної дії «мікс-фактора» у щурів з Cu-індукованим токсикозом (доза ЛД₃₃). Для цього тваринам перед інтоксикацією сірчаною кислотою міддю вводили «мікс-фактор» в дозі 0,05 мл/100 г маси тіла та встановили ефект, що підтверджує антитоксичну дію за показниками маси тіла, температури, часу плавання, які не відрізнялися від таких у тварин контрольної групи. Кількість еритроцитів при профілактичному застосуванні «мікс-фактора» не відрізнялася у порівнянні з контрольною групою, на відміну від тварин, які отримували лише токсикант мідь. Означений ефект був підтверджений і при застосуванні летальних доз сірчаною кислотою міді. Отже, «мікс-фактор» здатен посилювати гормезисний ефект до іонів міді.

При застосуванні низькомолекулярних компонентів молозива (НКМ) зафіксовані аналогічні до «мікс-фактору» ефекти. Дисертант робить висновок про здатність НКМ усувати інгібування загального метаболізму іонами міді.

Вплив «мікс-фактора» і НКМ (*підрозділ 3.3*) на показники ПОЛ-АОС (вміст гідроперекисів ліпідів та активність глутатіонпероксидази) переконливо свідчить про усунення проявів окисного стресу у тварин з Cu-індукованим токсикозом. Однак подібний антиоксидантний ефект може бути забезпечений різними механізмами (наприкладі зміни активності ферменту глутатіонпероксидази: за дії НКМ зафіксовано збільшення на 68%, а «мікс-фактору» - активність ГП була майже на рівні інтактних тварин.

Звідси, наступна серія експериментів була присвячена вивченню антиоксидантних властивостей НКМ в залежності від дози. Встановлено, між активністю глутатіонпероксидази та вмістом гідроперекисів ліпідів існує Y-подібна залежність, тобто при малих концентраціях НКМ виявляє

антиоксидантну активність, а при великих навпаки - прооксидантну. Тому, стверджувати, що НКМ є антиоксидантом або прооксидантом не коректно.

Невеликий підрозділ присвячений вивченню впливу «мікс-фактора» і НКМ на вміст холестеролу, триацилгліцеролів, креатиніну, альбуміну в сироватці крові після інтоксикації сірчаною кислотою міддю. Інтоксикація тварин не приводить до вірогідних змін досліджуваних показників, можливо за рахунок нетривалого терміну експерименту. Звідси, і вірогідних змін цих показників за дії досліджуваних об'єктів теж не спостерігалось, хоча відмічалася тенденція до покращення.

Логічним було далі проведення експериментів по вивченню стану показників редокс-системи в мітохондріях (основне місце утворення гідроперекисів ліпідів) і мікросомах печінки, де відбувається біотрансформація ксенобіотиків, за умов Cu-індукованого токсикозу і дії біологічних субстанцій. При цьому визначений подібний ефект «мікс-фактора» і НКМ в мітохондріях до такого в сироватці крові. Спостерігалось зниження вмісту гідроперекисів ліпідів і підвищення активності ГП. У фракції цитозоля активність ГП підвищувалась в меншій мірі, а ГР взагалі практично не змінювалась. У фракції мікросом також відмічалось підвищення активності ГП і ГТ. Отримані результати переконливо свідчать про наявність антиоксидантних властивостей «мікс-фактора» і НКМ. Подібні ефекти визначені також і за умов спонтанного та аскорбат-індукованого ПОЛ.

Враховуючи встановлені ефекти «мікс-фактора» і НКМ щодо усунення проявів окисного стресу у тварин на моделі інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю, надалі науковий інтерес дисертанта був спрямований на з'ясування стану редокс-системи в онтогенезі (в залежності від віку організму). Дослідження проведені у дорослих тварин (12 міс), 22 міс тварин, яким починали вводити «мікс-фактор», і 33 міс тварин. Результати показали порушення в про-антиоксидантній системі старих (33 міс) тварин, що позначилося на підвищенні вмісту гідроперекисів ліпідів в мітохондріях печінки порівняно з 12 міс тваринами та зниженні активності ГП (на 25%).

Застосування «мікс-фактора» відновлювало активність ГП і рівень ГПЛ до значень 12 міс щурів.

Тривалий прийом «мікс-фактора» з 22 міс віку уповільнював загибель тварин у термін з 740 днів до 800 днів, що свідчить про його ефект на більш пізніх етапах онтогенезу. «Мікс-фактор» поліпшував адаптивну здатність організму старих тварин до фізичних навантажень (за тестом «біг у тредбані до виснаження»). За висновками дисертанта, отримані результати не дають підстав віднести «мікс-фактор» до геропротекторів, але його вплив на працездатність і адаптивність організму до стресових факторів очевидна.

В останньому підрозділі представлено обговорення отриманих результатів. Слід зазначити, що дисертант провів ретельний, логічний, глибокий аналіз результатів власних досліджень, визначаючи що інтоксикація організму іонами міді супроводжується вираженою системною відповіддю, яка проявляється на різних рівнях організації. Відбувається пригнічення загального метаболізму (на прикладі соматометричних показників), можливий розвиток адаптивного окисного стресу, формування гормезисного ефекту до сірчаноокислої міді та ін.

Всебічно обґрунтовані можливі механізми антиоксидантної дії біологічно активних добавок «мікс-фактора» і НКМ.

Дисертація закінчується *висновками, списком використаних джерел і додатком*. Висновки впливають із суті проведеного дослідження, достатньо обґрунтовані, логічні, конкретні.

6. Завершеність дисертації в цілому та її відповідність встановленим вимогам.

За своєю структурою, об'ємом виконаних досліджень, отриманими результатами, сформульованими науковими положеннями і висновками дисертація Мохаммада Моршед Айед Алсардіа є завершеною науково-дослідною роботою. Достатній обсяг та різноманітність досліджень дозволила здобувачу успішно вирішити поставлені у роботі завдання та досягти її мети.

7. Достовірність і новизна наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертаційне дослідження Мохаммада Моршед Аїед Алсардіа за достовірністю, новизною та репрезентативністю отриманих наукових результатів, їх літературним обґрунтуванням, достатньо великому обсязі досліджених біохімічних, соматометричних показників та адекватною їх статистичною обробкою в повній мірі відповідає існуючим методичним вимогам. Обґрунтування результатів досліджень проведено фахово, на високому науково-методичному рівні.

8. Зауваження та побажання до дисертації.

1. У Розділі 2 «Матеріали та методи» дослідження» відсутня характеристика методу визначення антирадикальних властивостей.

2. Бажано по тексту дисертаційної роботи навести вірогідність (t-критерій Стьюдента), що дозволило б оцінити статистичну значущість відмінностей середніх величин різних показників.

3. Слід використовувати сучасну класифікацію хімічних елементів (залізо – ферум, мідь – купрум і т. д.).

4. Логічно було б навести в Розділі 2 характеристику комплексу низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива (хімічний склад, фізико-хімічні характеристики та ін.). Перенести з Розділу 3.

5. Зустрічаються технічні помилки, стилістичні та граматичні помилки, неточності в термінології.

Наведені зауваження принципово не змінюють оцінку дисертаційної роботи. Проте, у порядку наукової дискусії хотілося б вислухати відповіді та судження з таких **питань**:

1. Досліджувані об'єкти «мікс-фактор» і комплекс низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива виявили достатньо виразний ефект щодо усунення проявів окислювального стресу на тлі інтоксикації тварин іонами міді. Які на Вашу думку компоненти (хімічного складу) виявляють антиокисидантні властивості?

2. Ви стверджуєте, що «мікс-фактор» має виражені антирадикальні властивості. Як Ви вважаєте, який механізм перехоплення ОН-радикалів при застосуванні «мікс-фактора»? Можливо, за рахунок яких компонентів?

3. Які можливі рекомендації при застосуванні досліджуваних зразків Ви можете визначити (умови зберігання, рекомендації по прийому, режими прийому та ін.)?

Зазначені зауваження та запитання не зменшують наукової новизни та практичної значимості роботи і тому не впливають на її позитивну оцінку.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Мохаммада Моршед Айед Алсардія «Дослідження механізмів «відновлення» певних біохімічних показників біологічно активними сполуками після дії токсичних доз іонів міді», за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів і можливістю їх практичного використання, теоретичним та практичним значенням, ступенем обґрунтованості наукових положень і рекомендацій, достовірністю зроблених висновків та повнотою викладу в опублікованих працях результатів досліджень цілком відповідає пп. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Мохаммад Моршед Айед Алсардія заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент,
професор кафедри біологічної хімії
Національного фармацевтичного
університету МОЗ України,
д.б.н., професор

В. М. Кравченко

Михайло В.М. Кравченко
Професор кафедри біологічної хімії
Національного фармацевтичного університету МОЗ України
15.11.13

