

ВІДГУК

**офіційного опонента на дисертацію Лебідь Катерини Миколаївни
«Дослідження біохімічної відповіді молодих і старих тварин на
гепатотоксичну дію сірчаноокислої міді та вплив біологічних антидотів»
подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних
наук
за спеціальністю 03.00.04 – біохімія**

Актуальність теми. Дисертаційна робота Лебідь К.М. присвячена актуальній тематиці сучасної біохімії – дослідження біохімічних механізмів розвитку уражень печінки йонами міді у молодих і старих тварин, що є одним із підходів у вирішенні проблем виникнення вік-залежних патологій і механізмів старіння. Автор дисертації правильно вказує, що однією з найбільш перевірених гіпотез геронтології залишається вільнорадикальна гіпотеза старіння. У зв'язку з цим, дослідження показників про-антиоксидантної системи при вік-залежних ураженнях печінки іонами сірчаноокислої міді дозволяє вирішувати кілька важливих питань: встановлення механізмів розвитку вік-залежних патологій, ролі окисного стресу в цих процесах і його ролі в механізмах старіння.

На сьогодні дуже багато робіт спрямовано на дослідження ключових біохімічних механізмів, за рахунок регуляції яких можна впливати на термін та якість життя. Тому дослідження впливу природних антиоксидантів, які забезпечують відновлення функцій печінки та стану про-антиоксидантної системи під час старіння, є актуальним для практичного застосування.

Об'єктом дослідження обрано продукти вільнорадикального окиснення ліпідів та ферментні системи антиоксидантного захисту у клітинах печінки при вік-залежних перебудовах, за умов інтоксикації сульфатом міді та застосування біологічних антидотів. *Предмет дослідження* – вік-залежні зміни інтенсивності процесів ПОЛ та активності антиоксидантних ферментів і NADP-залежних дегідрогеназ у печінці тварин у нормі, за умов інтоксикації сульфатом міді та застосуванні біологічних антидотів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт, що проводились протягом 2014 – 2017 років у рамках тем планової наукової роботи НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Виживаність і стійкість тварин до дії стресових факторів за експериментального прискореного та уповільненого старіння» № 0115U000490; «Отримання, скринінг та оцінка антитоксичних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікроводоростей» № 0115U000502.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій.

Роботу з лабораторними тваринами проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних Законів України. Комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол №8 від 19.10.2017 р.).

Оцінка дисертації щодо її змісту та оформлення.

Схема побудови роботи традиційна. Дисертацію викладено на 162 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел, проілюстрована 15 рисунками та 29 таблицями. Список літератури включає 244 найменувань, з яких 189 – латиницею).

В огляді літератури автором детально проаналізований матеріал відносно вік-залежних змін прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у печінці та крові тварин та при токсичному ураженні печінки. Приділена увага впливу аліментарних чинників на стан про-антиоксидантного балансу у печінці та аналіз існуючих способів корегування порушень про-антиоксидантного балансу у печінці за допомогою змін режиму харчування.

Наведені сучасні способи корегування порушень про-антиоксидантного балансу у печінці за допомогою екзогенних антидотів та гепатопротекторів.

У цілому розділ написаний лаконічно, легко приймається. Дисертантка продемонструвала високий рівень обізнаності в обраній тематиці.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» наведені підходи при проведенні експериментальних досліджень. Необхідно відмітити, що автором застосовані експериментальне моделювання *in vivo* інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном та циклічний режим годування тварин, сучасні біохімічні методи, які відповідають поставленим завданням: спектрофотометричні (для визначення вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, ізоцитратдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, 6-фосфоглюконатдегідрогенази та малатдегідрогенази), метод диференціального центрифугування, статистична обробка даних за допомогою програми Microsoft Excel та програмного пакета Statistica 6.

Результати та їх обговорення представлені у 3 розділах власних експериментальних досліджень, які проведені на високому науково-методичному рівні. На першому етапі дисертантка визначила вік-залежні зміни показників прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці та крові щурів при інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном (розділ 3.1). Отримані результати сформульовані у перших 4-х висновках:

1. Встановлено вік-залежні механізми відповідної реакції прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці щурів при інтоксикації сульфатом міді, застосуванні циклічного режиму годування та впливі біологічних антидотів, що виражалися у модуляції активності антиоксидантних ферментів та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів у печінці та крові тварин.

2. Інтоксикація трикратним введенням LD33 сірчаноокислої міді через 24 години у молодих та старих щурів супроводжується аналогічними змінами показників про-антиоксидантного балансу: інтенсифікацією процесів ПОЛ на фоні інгібування активності глутатіонпероксидази, глутаредоксину і

ізоцитратдегідрогенази, а також підвищенням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у мітохондріях та цитозолі клітин печінки.

3. Через 1 і 2 місяці після інтоксикації сульфатом міді показники інтенсивності ПОЛ у молодих тварин нормалізуються, а у старих залишаються достовірно вище контрольного рівня. Підвищений вміст продуктів ПОЛ у молодих тварин і знижена активність аконітатгідратази у мітохондріях і глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові не нормалізуються через 1 і 2 місяці після інтоксикації та вимагають корегування за допомогою екзогенного чи ендогенного стимулювання.

4. Введення сірчанокислої міді і тетрахлорметану індукує однотипні зміни вивчених показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу. Си-індуковане пошкодження печінки щурів може бути ефективною моделлю для вивчення молекулярних механізмів вікових порушень прооксидантно-антиоксидантної системи організму та використовуватися для скринінгу способів, що сповільнюють вільнорадикальне пошкодження печінки.

У Розділі 3.2. Вік-залежний вплив циклічного режиму харчування на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді представлені нові результати, які дозволили зробити висновки 5 та 6:

5. Зміни показників прооксидантно-антиоксидантного балансу при циклічному режимі годування носять вік-залежний характер. Найбільш значні відмінності у молодих та старих тварин спостерігаються при повторному циклі втрати та відновлення маси тіла. Більшість вивчених показників у 20-місячних тварин після ЦРГ сягають рівня контролю, а у 3-місячних відбувається зниження вмісту МДА у цитозолі та мікросомах печінки, активності аконітази на фоні підвищення активності глутатіонпероксидази у мітохондріях відносно контрольного рівня.

6. Показано, що переведення тварин з Си-індукованим пошкодженням печінки на циклічний режим годування після проходження двох циклів ЦРГ нормалізує більшість вивчених показників прооксидантно-антиоксидантного

потенціалу у старих тварин, а у молодих індукує зрушення у бік антиоксидантного потенціалу.

Особливий інтерес становить дослідження, що представлено у розділі 3.3. Вік-залежний вплив комплексу «Мікс фактор» (Фунгідол) та комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді.

Встановлено, що субстанція «Мікс фактор» і комплекс низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива, сприяючи підвищенню активності антиоксидантних ферментів у печінці і крові щурів, мають протекторні властивості щодо прооксидантної дії сірчаноокислої міді та є перспективними підходами для вивчення та розробки природних систем регуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці при патологічних змінах, спричинених інтоксикацією сульфатом міді (висн. 7).

Дисертаційна робота Лебідь К.М. є цілісним завершеним дослідженням, результати добре апробовані на вітчизняних і міжнародних фахових конференціях, а також публікаціях у фахових та закордонних виданнях. За результатами досліджень, наведених у дисертаційній роботі, опубліковано 10 наукових робіт, з яких: 5 статей у зарубіжних наукових фахових виданнях (з них 2 у виданні, що входить до наукометричної бази Scopus) та 5 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Проте можна висловити деякі зауваження та питання дискусійного характеру до дисертантки, які суттєво не впливають на значимість представленої роботи:

1. Який зміст автор вкладає у поняття «біологічний антидот»?
2. У тексті треба застосовувати якусь одну систему аббревіатури (українську або латинську), а не змішану (NADP-залежних дегідрогеназ, GSH-залежних, та ін.)
3. Питання до обраної дози «Розчин сірчаноокислої міді вранці до годування в дозі 1 мг / 100 г маси тіла (0,23 мг / 1 г печінки), що

відповідає LD₃₃ тричі з інтервалом в 48 годин». Що значить «LD₃₃ тричі з інтервалом в 48 годин»? То LD₃₃ є 1 мг або 3 мг на 100 г маси тіла? Чому обрана саме така доза?

4. Експериментальні групи переводились на циклічний режим годування (ЦРГ) при якому тварин переводили на такий режим годування, при якому вони за 14 днів втрачали до 30 % маси тіла. Яка кореляція ризиків втрати 30 % маси тіла у щурів та людини за нормальних фізіологічних умов?
5. Щодо скорочення одиниць, якщо у назві таблиці вказується «Вміст малонового діальдегіду у сироватці крові», то вказувати МДА (нмоль/мл) замість МДА (нмоль МДА/ мл сир.).
- 6 У табл. 3.5. показники вмісту МДА у цитозолі клітин печінки в контролі та при інтоксикації сульфатом міді у 3- та 20-місячних щурів

Показник	вік	контроль	24 год.	1 місяць	2 місяці
МДА (нмоль МДА/мг білку цт)	3 міс	0,106±0,01	0,190±0,01*	-	-
	20 міс	0,114±0,010	0,173±0,040*	-	-

Через 1 та 2 місяці зовсім немає МДА, або не вимірювали?

7. На стор. 68 «Пероксид водню пригнічує фермент за змішаним типом (Кі 0,36 мМ і 0,95 мМ в нормі і при експериментальному токсичному гепатиті відповідно) [97]». Кі це Cu?
8. Вплив сульфату міді на досліджувані показники є більш результатом дії йонів Cu, або сульфату?
9. За рахунок яких складових комплексу «Мікс фактор» проявляє антирадикальні властивості?
10. Бажано використовувати сучасні правила правопису, особливо хімічних елементів (назва елементів з великої літери), іони (йони), внутрішньобрюшинно (внутрішньочеревно), *pes os* (*per os*) тощо.
11. Не вистачило узагальнення отриманих результатів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Загалом дисертаційна робота справляє добре враження, актуальність, новизна, обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність не викликає сумнівів. Робота має теоретичне і практичне значення. Одержані новітні дані про активність антиоксидантних ферментів у печінці та крові молодих і старих тварин при Су-індукованому пошкодженні печінки мають велике значення як для фундаментальної біохімії, так і для практичного застосування у біології та медицині.

Публікації в повній мірі відображають основні положення, висновки та рекомендації, які сформульовані в дисертації. Основні положення дисертації ідентичні вмісту автореферату. Висновки роботи відповідають завданням досліджень, достовірність яких не викликає сумнівів.

Враховуючи вище викладене: актуальність, новизну, високий науково-методичний рівень, теоретичне і практичне значення роботи, обґрунтованість наукових положень висновків і рекомендацій, вважаю, що дисертація Лебідь Катерини Миколаївни «Дослідження біохімічної відповіді молодих і старих тварин на гепатотоксичну дію сірчанокислої міді та вплив біологічних антидотів» є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам п.п. 9,11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ N 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016 р.) та наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12. 01. 2017 року щодо оформлення результатів та їх аргументованої оцінки, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія.

Зав. кафедри біофізики та біохімії
Дніпровського національного
університету імені Олеся Гончара,
док-р. біол. наук (03.00.04-біохімія), проф.

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара
Навчальний відділ кадрів
Г.О. Ушакова
03.09.2018

Г.О. Ушакова