

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
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Для розуміння біологічної ролі купруму якнайкраще підходить аналогія з дволиким Янусом (Leary and Winge, 2007). Менше одного іону купруму ($<10^{-18}M$) у клітинах знаходиться у незакомплексованому стані (Huffman and O'Halloran, 2000), а його біологічні функції визначаються редокс статусом, що у свою чергу, забезпечує рівень зв'язування з функціональними і депонувальними молекулами, а токсичність, відповідно, редокс-активністю надлишку незв'язаних іонів (Festa and Thiele, 2012). Тому ініціація окисного ураження клітинних структур, безперечно, є головною ознакою перевищення есенціального рівня купруму у клітинах. Ці методологічні положення покладено в основу багаторічних досліджень наукової школи, очолюваної проф. А.І. Божковим, який ще у 1997 р довів тезу про три дозозалежні стадії дії іонів міді на функціональну активність біологічних систем (Биохимия, 1997). Дослідження вікових особливостей молекулярних систем депонування та детоксикації купруму є логічним продовженням цього напрямку досліджень. Серед вікових популяцій людини особливо вразливим є дитячий організм, наголошується на отруєннях під-час гемодіалізу (National Research Council - 2000). Очікуваним є також послаблення адаптивних процесів у похилому віці. Проте дисертантом анонсовано не лише дослідження специфічних проявів впливу купруму на редокс-залежні процеси у різному віці, але й спробу довести модель гепатотоксичності, альтернативну моделі впливу тетрахлорметану CCl_4 . Такі дослідження актуальні з огляду на те, що ураження печінки, що призводять до цирозу, властиві за даними Schuppan and Afdhal (2008) для близько 1% населення планети, причому єдиним ефективним шляхом лікування залишається трансплантація, тоді як фармакологічна терапія, що ґрунтується на розумінні молекулярних механізмів патології, знаходиться на ранніх стадіях розвитку. Практична актуальність дослідження визначається також тим, що, не зважаючи на кардинальну зміну спектру ксенобіотиків у останні десятиліття, купрум залишається одним з найбільш масових гепатотоксикантів, що як складник агрохімікатів, побутових засобів, зокрема і в Україні (Stolyar et al., 2008). Це зумовлює пошук ефективних і доступних антидотів гепатотоксичності купруму. Відтак, тема дослідження має наукову і практичну актуальність.

Зв'язок теми з державними і галузевими програмами.

Дисертаційну роботу виконано у рамках науково-дослідних робіт НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна згідно планів НДР «Вживаність і стійкість тварин до дії стресових факторів за експериментального

прискороного та уповільненого старіння» № 0115U000490; «Отримання, скринінг та оцінка антитоксичних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікрородоростей» № 0115U000502 протягом 2014-2017 рр, що свідчить про державну значимість досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у системному підході і оригінальному експериментальному підході до дослідження біохімічних механізмів гостротоксичної дії іонів купруму, в результаті чого встановлено розбалансування рівня активності редокс-визначальних ензимів та розвитку окисного стресу в організмі щурів різного віку. Принципову новизну має доведення відповідності у показниках окисного ураження за впливу купрум сульфату (CuSO_4) та CCl_4 . Встановлено, що запропонований режим циклічного голодування має корегуючу дію на редокс баланс у клітинах щурів у нормі та за впливу CuSO_4 та залежно від віку. Виявлено позитивний вплив комплексів низькомолекулярних компонентів біологічного походження «Мікс фактор» та коров'ячого молозива (НKM) на редокс-залежні ензими у печінці щурів. Аналіз джерел літератури свідчить про наявність лише фрагментарних досліджень такого спрямування у реферованих виданнях. Відтак, новизна результатів, представлених у рецензованій дисертації, не викликає сумніву.

Практичне значення і перспектива роботи полягає у розробці альтернативної експериментальної моделі гепатотоксичності, індукованої CuSO_4 , що може мати переваги перед відомою моделлю індукції вільнорадикальної патології за допомогою CCl_4 . Запропоновано низку схем корекції гепатотоксичності з врахуванням вікового статусу. Здобуті результати актуалізовано у педагогічній діяльності.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації.

Дисертація виконана на достатньому обсязі експериментального матеріалу із дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, забезпеченням адекватних контролів, використанням методів біохімічного аналізу, які адекватні меті та задачам роботи та інформативні. Результати досліджень статистично опрацьовані. Наукові положення обґрунтовані, висновки відповідають поставленим задачам та змісту роботи і повністю відображають результати.

Матеріали дисертаційної роботи у повному обсязі відображено у 5 статтях у фахових виданнях з біологічних наук, з них 2 статті - у наукових періодичних виданнях, включених до наукометричної бази Scopus; а також доповідались на наукових конференціях національного та міжнародного рівня (5 тез доповідей). Здобувачеві належить суттєвий внесок у плануванні експерименту, його виконанні, опрацюванні наукової літератури та отриманих результатів.

Структура роботи Дисертаційну роботу К.М. Лебідь викладено за класичною схемою на 164 сторінках комп'ютерного набору, з яких 117

стор. основного тексту. Вона побудована за традиційною схемою: складається зі вступу (стор. 18-23), аналітичного огляду літератури (стор. 24–47, 20 % основної частини), матеріалів і методів дослідження (стор. 48–58), розділу, анонсованого як обговорення результатів власних досліджень (стор. 59-129), завершується сьомою висновками та списком використаної літератури (244 найменування). Співвідношення та обсяг окремих частин роботи відповідають вимогам до оформлення дисертації, затвердженим МОН України. Результати роботи проілюстровано 15 рисунками та 29 таблицями.

Аналіз змісту дисертаційної роботи. У Вступі автор на підставі критичного аналізу джерел літератури обґрунтовує актуальність дослідження показників антиоксидантного статусу як індикаторів корегування патологічних станів печінки, відмінності у адаптаційному потенціалі систем детоксикації печінки залежно від віку та доцільність апробування препаратів біологічного походження з антиоксидантною активністю для корегування патологічних станів печінки. Дисертант коректно формулює мету і задачі, об'єкт і предмет дослідження. Слід відзначити, що перелік обраних маркерів відмінний від традиційного набору, що використовується для оцінки окисного ураження, і включає широкий спектр ензимів обміну глутатіону (GSH) та низки дегідрогеназ цитоплазми, мітохондрій гепатоцитів та крові, що розширює аналітичні можливості у вирішенні поставленої мети. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

Огляд літератури присвячено аналізу особливостей антиоксидантно-прооксидантного балансу (АПБ) у печінці та крові тварин за умов інтоксикації печінки (1.2) та залежно від віку (1.1), а також впливу чинників та режимів харчування у реакції тканин печінки на окисний стрес (1.3) та її модуляцію екзогенними антидотами та гепатопротекторами (1.4). У розділі достатньо повно розглянуто інформаційні та методологічні засади дослідження з використанням сучасних та класичних наукових джерел. Позитивною рисою розділу є послідовна апеліяція до результатів дослідження власного колективу. Дисертант наводить класифікацію вікових стадій АПБ та прооксидантного потенціалу, напрацьовану у колективі (с. 27), обґрунтовує вибір МДА, ензимів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) та GSH-залежних ензимів як коректних біомаркерів стесу та окисного ураження. Особливо цікавим є перспектива дослідження аконітази, як ензиму, що містить ферум-сульфур-кластерну структуру і може функціонально характеризувати купрум-ферум взаємозв'язки у окисному стресі. У підрозділі 1.2. подається також токсикологічна характеристика сполук, застосованих як токсиканти у власному дослідженні. У Висновку до розділу обґрунтовано перспективи власного дослідження виходячи з наявного досвіду у галузі і логіки пошуку у науковому колективі. Загалом, зміст розділу свідчить, що автор добре орієнтується у науковій літературі та уміло систематизує інформацію.

У розділі «*Матеріали і методи дослідження*» подано схеми проведення експерименту та детальний опис методів дослідження. Опис груп

свідчить, що проведено чотири етапи досліджень з використанням двох вікових груп щурів, кожен з яких включав коректні контролю, охоплював тривалий час досліджень (2 місяці після трьохкратного введення сполуки купруму), концентрацію токсикантів, що відповідає LD₃₃ (1,4 мкмоль Cu·г⁻¹ тканини) і був досить працемістким. Дисертант використав класичні методи спектрофотометричного аналізу активності ензимів та продуктів окисного ураження ліпідів. Обраний набір методів є достатнім для характеристики окисного ураження ліпідів у печінці та сироватці крові, а також забезпечення редокс-потенціалу клітини мітохондріальними ензимами та глутатіоновою (GSH) системою. Разом з тим, включення у набір тестів визначення власне концентрації GSH та редокс індексу GSH/GSSG з огляду на ключову роль цього тіолу у реакції на вплив купруму посилює доказову базу роботи. Розділ завершується узагальненням щодо робіт, у яких автором було використано дані експериментальні схеми та методи.

У розділі III, названому «Обговорення результатів дослідження», замість «Результати та їх обговорення», дисертант систематизує результати власних досліджень у відповідності до експериментальних серій. У підрозділі 3.1. автор доводить подібність низки ознак гепатотоксичності та її вікових змін у печінці та крові щурів при інтоксикації CuSO₄ та CCl₄ через 24 год після серії введення токсинів. Важливо, що окисний стрес, індукований купрумом, та визначений за утворенням ТБК-АП, не зникав у старих щурів, на відміну від молодих, протягом 1-2 місяців після інтоксикації. Ці закономірності доведено на прикладі низки показників мітохондрій і цитозоля клітин печінки та сироватки крові. Не виявлено вікових відмінностей у рівні та реакції аконітазної активності за впливу купруму, що, на нашу думку, надає цьому ензиму ролі маркера токсичності редокс-активних металів та доповнює інформацію про цю ознаку як прояв нейротоксичності за впливу мангану, купруму, феруму (симптоми хвороби Паркінсона) (Zheng et al., 1998).

У підрозділі 3.2. послідовно доводиться, що активність системи антиоксидантного захисту та ЦТК за циклічного режиму харчування змінюється. Особливо активується активність редокс-залежних ензимів у старих тварин. Ці зміни модулюють реакцію на вплив іонів купруму, причому у молодих щурів активність ензимів печінки та сироватки крові виявляється вищою, ніж у старих, а утворення ТБК-активних продуктів – нижчим. Найбільш ефективними ознаками ефективності режиму циклічного голодування виявилися глутатіонпероксидазна та ізоцитратдегідрогеназна активності у мітохондріях печінки.

Доведено позитивний вплив препаратів «Фунгідол» («Мікс-фактор») та НКМ на активність ензимів та утворення продуктів ПОЛ за різних схем введення поряд з інтоксикацією купрум сульфатом (підрозділ 3.3). При цьому встановлено вікові особливості, наприклад, що цікаво, ефективніше відтворення активності аконітази у мітохондріях старих щурів. Аналогічні факти продемонстровані для впливу комплексу НКМ. Цікаво, що у даному випадку

аконітаза була більш резистентною до корегуючого впливу у старих тварин, тоді як активність глутаредоксину корегувалась введенням «Мікс-фактору (Фунгідол)» у молодих, але не старих щурів. Ці та інші наведені результати свідчать про ефективність застосованих потенційних антидотів та дають підстави для їх застосування у різних вікових групах. Висновок до Розділу 3 (с 126-129) узагальнює та аналізує результати дослідження.

Автор формулює сім *висновків*, які загалом відображають сутність отриманих результатів і відповідають поставленим задачам.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка питань дискусійного характеру та зауважень до оформлення.

1. Як автор визначає терміни, що експлуатуються у роботі: «прооксидантно-антиоксидантні» баланс та потенціал, та чи достатньо аргументовані висновки про їх зміни на підставі представлених результатів?
2. Як дисертант пояснює причини змін ензимної активності протягом гострої та хронічної фаз гепатотоксичності.
3. Для повноти аргументації досліджуваної біохімічної відповіді не вистачає результатів про вміст та співвідношення глутатіону (GSH&GSSG), NADPH/NADP⁺, NADH/NAD⁺ або ж лактат/піруват.
4. Немає аргументації активності «Se-глутатіонпероксидази як основного ферменту, який утилізує МДА у крові тварин». У літературі нами не знайдено підстав для такого твердження (Ayala et al., 2014. Review Article. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>; Agadjanyan et al., 2005. “A new role of phosphoglucose isomerase. Involvement of the glycolytic enzyme in aldehyde metabolism,” Biochemistry, vol. 70, pp. 1251–1255.
5. Бажано аргументувати версію про взаємозв'язок між втратою аконітазної активності у мітохондріях та генерацією ПОЛ (с 7 автореферату, с 62 дисертації). Гіпотеза щодо участі мітохондральної форми аконітази у метаболізмі феруму, зокрема його виході з мітохондрій, видаються не цілком переконливими, адже це функція цитоплазматичної форми ензиму, яка також зазнає ураження за впливу редокс-активних металів (Zheng et al., 1998. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. Brain Res. 1998 Jul 20; 799(2): 334–342.).
6. У підрозділі 3.2 та авторефераті (с. 10, 13) не варто констатувати вдруге зміни (вмісту МДА у мітохондріях, тощо), викликані лише введенням купруму (позитивний контроль), оскільки вони повторюють закономірності, встановлені у підрозділі 3.1 за тих самих експериментальних умов.
7. Дія ССl₄ вивчалась тільки після 24 год після 3-х разового введення, тобто слід підкреслити (Висновок 4), що подібність гепатотоксичності спостерігалась лише за ознаками гострої токсичності.

8. На рис. 3.1, 3.2 тощо невдало подаються дані у вигляді ліній, що з'єднує окремі групи. Такий спосіб коректний для відображення динаміки процесу, а у даному випадку слід використати стовпчикову діаграму.

9. Технічні огріхи: Табл 3.25 – невдале розташування – с 121-122; С 26 – не «ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД», а **Огляд літератури**; С 59: чому розділ 3 названо «Обговорення результатів»? Насправді це «Результати дослідження та їх обговорення», подекуди відсутні коми у складнопідрядних реченнях та непослідовно вживається аббревіатура.

Зауваження, які виникли до рецензованої роботи, носять здебільшого дискусійний характер, а встановлені недоліки у оформленні не применшують наукової цінності отриманих результатів.

Висновок про відповідність

В цілому дисертація К.М. Лебідь є завершеною експериментальною роботою, яку відзначає послідовність у вирішенні конкретного питання біохімії – з'ясування особливостей функціонування ензимного забезпечення клітин печінки та сироватки крові щурів та його взаємозв'язку з окисним ураженням ліпідів за впливу іонів купруму залежно від віку та можливостей його корекції. Одержані результати відкривають нові можливості у корекції ураження сполуками купруму та моделюванні гепатотоксичних станів.

На основі вищезазначеного вважаю, що кандидатська дисертація Лебідь Катерини Миколаївни « Дослідження біохімічної відповіді молодих і старих тварин на гепатотоксичну дію сірчаноокислої міді та вплив біологічних антидотів» за актуальністю проблеми, методичними підходами, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів 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.) щодо оформлення результатів та їх аргументованої оцінки, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія.

Керівник науково-дослідної лабораторії
порівняльної біохімії та молекулярної біології
професор кафедри хімії
та методики її навчання
Тернопільського національного
педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка
доктор біологічних наук

31.08.2018



О.Б. Столяр

Планс
з а с в і д ч у ю: [Signature]
Начальник відділу кадрів

Семехота А.У.