

Відгук

на дисертаційну роботу Мохаммад Моршед Аїед Алсардіа
«Дослідження механізмів «відновлення» певних біохімічних
показників біологічно активними сполуками після дії токсичних доз
іонів міді», яка подана до спеціалізованої вченої ради К 64.051.17
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

1. Актуальність теми дослідження та її зв'язок з державними та галузевими науковими програмами

З'ясування механізмів регуляції біологічних процесів є пріоритетним напрямком сучасної біохімії. Розуміння інтегральних механізмів регуляції метаболізму та підтримання гомеостазу в нормі та за патологічних станів є надзвичайно важливим як для профілактики, так і для терапії різноманітних захворювань.

У патології більшості захворювань (серцево-судинних, онкологічних, та ін.), як показано у сучасних дослідженнях, є порушення співвідношення показників про-антиоксидантної системи.

Встановлено, що зміщення рівноваги в бік прооксидантів формує окислювальний стрес і на його тлі розвиваються різні патології. Проте не з'ясовано чи є окислювальний стрес причиною або наслідком розвитку патології і старіння організму. Разом з тим в останніх дослідженнях показано, що продукти вільнорадикальних процесів в ряді випадків виконують регуляторні функції. Отже, продукти вільних радикалів в біологічних системах виконують різні функції. На сьогодні дослідження фізіологічної або патологічної ролі продуктів вільнорадикальних реакцій є важливим і актуальним завданням сучасної біохімії.

Відомо, що зміна показників про-антиоксидантної системи відбувається в організмі при наявності різних токсичних сполук різної природи, у тому числі й іонів важких металів.

Встановлено, що іони міді – є одними з найбільш поширених токсичних сполук водного середовища. Збільшення вмісту іонів міді в організмі супроводжується порушенням метаболізму і розвитком цілого ряду патологій. Проте остаточно не з'ясовано прооксидативні властивості іонів міді і викликані під їх впливом порушення біохімічних показників, а наявні дані досить суперечливі, і тому це питання потребує глибокого вивчення.

У попередніх дослідженнях показано, що використання низькомолекулярних компонентів біологічного походження (рослинного, тваринного) в якості регуляторів окисного стресу може бути перспективним підходом в дослідженні механізмів регуляції біологічних процесів. Виходячи з цього дисертаційна робота Мохаммад Моршед Аїед Алсардіа «Дослідження механізмів «відновлення» певних біохімічних показників біологічно

активними сполуками після дії токсичних доз іонів міді» є актуальною для вирішення теоретичних і практичних питань біохімії.

Дисертаційна робота виконана у відділі біофізики мембран та відділі молекулярної біології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

2. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертаційного дослідження, наукова новизна

Детальне ознайомлення зі змістом дисертаційного дослідження та авторефератом здобувача, опублікованими працями за темою дисертації, дає змогу зробити висновок про те, що основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації, які визначають наукову новизну роботи, є досить обґрунтованими та сформульовані автором самостійно. Методи дослідження є валідними і відповідають поставленій проблемі. Вірогідність одержаних результатів підтверджується використанням біохімічних, фізіологічних, гістологічних методів досліджень.

Наукова новизна полягає в тому, що низькомолекулярні компоненти, отримані з різних біологічних об'єктів (різні види грибів («мікс-фактор»), низькомолекулярні компоненти молозива) мають здатність усувати окислювальний стрес, який індукований дією іонів міді або виникає внаслідок природного старіння організму. Вперше з'ясовано, що попередній прийом «мікс-фактора» усуває токсичну дію сірчаноокислої міді, тобто він проявляє властивості антидоту. Досліджено, що низькомолекулярні компоненти молозива здатні виявляти як антиоксидантні властивості (при низьких концентраціях 0,05 - 0,1 мг / 100 г), так і прооксидантні властивості (при високих концентраціях більш 1 мг / 100 г маси тіла), що забезпечує їхню здатність регулювати функції про-антиоксидантної системи.

Вперше показано, що «мікс-фактор» і низькомолекулярні компоненти молозива нормалізували показники про-антиоксидантної системи, фізіологічну активність тварин і біохімічні показники функціональної активності печінки у тварин з Cu-індукованим фіброзом. Показано, що збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів в мітохондріях печінки і сироватці крові на тлі зменшення активності глутатіонпероксидази в цих системах на пізніх етапах онтогенезу (30 - 33 міс віку), може бути відновлено тривалим прийомом м'яких доз «мікс-фактора», що корелювало з поліпшенням якості і тривалістю життя таких тварин, тобто «мікс-фактор» може розглядатися як потенційний геропротектор.

3. Зміст та завершеність дисертаційного дослідження. Рецензована робота викладена на 147 сторінках, з них основного тексту 107. Експериментальні дані добре проілюстровані, і представлені рисунками (27) та у таблицях (5).

Дисертація написана за традиційною схемою і відповідає вимогам МОН України до кандидатських дисертацій. Вона складається з анотації українською та англійською мовами, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури (розділ 1), опису матеріалів та методів досліджень (розділ

2), викладення результатів власних досліджень та їх обговорення (розділ 3), висновків, списку використаних джерел, що містить 196 найменувань з них 115 латиною та додатку зі списком публікацій здобувача.

У вступі на основі аналізу сучасних наукових джерел стосовно впливу важких металів на показники про-антиоксидантної системи, інтегративної ролі цих показників у регуляторних системах організму при патологічних станах автор обґрунтовує актуальність обраної теми дисертації – дослідження застосування низькомолекулярних компонентів біологічного походження (рослинного, тваринного) в якості регуляторів окисного стресу, викликаного сірчаноокислою міддю, що може бути перспективним підходом в дослідженні механізмів регуляції біологічних процесів, визначає мету і завдання роботи та наукову новизну і практичне значення отриманих результатів. Також представлено особистий внесок здобувача та відомості про апробацію результатів, структуру і обсяг роботи.

В огляді літератури наводяться сучасні дані стосовно ролі біологічно-активних сполук у механізмах регуляції запальних процесів. Детально описано розвиток запального процесу та чинники, що його викликають і зроблено акцент на участі в цьому процесі іонів важких металів. Зроблено визначення важких металів різними авторами, приводиться класифікація важких металів. Слід відзначити широке висвітлення метаболізму ксенобіотиків в організмі, що відбувається у три фази за участю детоксицируючих систем (більш детально розкрито участь глутатіонової системи) та його генетичний контроль. Показано, що саме від метаболічного статусу організму залежать ризик розвитку та характер перебігу багатьох захворювань. Показано вміст і розподіл міді в організмі, шляхи засвоєння через шлунково-кишковий тракт та роль печінки в її обміні, нейрогуморальні механізми регуляції, розкрито фізіологічні функції міді. Висвітлено клінічні й експериментальні дослідження щодо впливу дефіциту та надлишку міді на метаболічні процеси, останнє проявляється у розвитку токсичного ефекту, пов'язаного з виникненням окислювального стресу та його наслідки (збільшення концентрації активних форм кисню, що призводить до модифікації білків, активації перекісного окислення ліпідів, індукція апоптозу). Наведено дані про можливі механізми захисту при оксидативному стресі й участі в цих механізмах біологічних субстанцій, до складу яких входять різноманітні біологічно активні речовини.

До зауважень огляду літератури: доцільним було показати шляхи надходження важких металів і, особливо міді, у докільця і до організму людини, слід було навести більш детальний аналіз застосування біологічних субстанцій «мікс-фактор» і низькомолекулярних компонентів молозива, а можливо й інших при окислювальному стресі.

Другий розділ дисертації присвячений опису матеріалів та методів дослідження. В роботі використано морфофізіологічні методи – визначення маси і температури тіла тварин, їх працездатності у плавальному тесті та бігом у третбані, гістологічні дослідження печінки, також затосовані препаративні

методи для отримання сироватки, еритроцитів, фракцій мітохондрій і мембран ендоплазматичного ретикулума; спектрофотометричні методи визначення активності аланінамінотрансферази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, малатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази, глутатіон-S-трансферази, аконітатгідратази, концентрації креатиніну, вмісту альбуміну і гідроперекисів ліпідів; колориметричний для визначення концентрації холестерину, а також ферментативний метод (концентрація триацилгліцеролів) та ферментативно-кінетичний метод (активність гамма-глутамілтрансферази). Методи дисертаційної роботи відповідають її задачам.

Зауваження до другого розділу: наведена схема експерименту (рис. 2.1) лише частково відображає етапи дослідження. Для більш чіткого та повного уявлення цілісної картини досліджень та всіх етапів роботи (у тому числі із застосуванням низькомолекулярних компонентів молозива) бажано було б навести загальну схему проведення досліджень.

У третьому розділі наведено результати власних досліджень та їх обговорення. У першому підрозділі (3.1) розглядаються морфофізіологічні та біохімічні характеристики тварин із Cu-індукованим токсикозом. Показано, що введення сірчаної кислоти міді супроводжувалося зміною низки морфофізіологічних показників (зниженням маси тіла щурів, зниженням температури тіла та зниженням їх працездатності у тесті з плаванням) при цьому основні біохімічні параметри печінки (активність трансферази, вміст креатину, альбуміну, триацилгліцеридів) залишилися в межах норми. Проте розвивається окислювальний стрес – інгібується глутатіонпероксидаза, збільшується вміст гідроперекисів ліпідів в сировотці крові, збільшується активність гамма-глутамілтрансферази. Автор робить висновок про початкові стадії дисфункції печінки, що супроводжувалися розвитком запального процесу, підтвердженого на гістологічних зрізах. Вироблена авторами модель Cu-індукованого токсикозу, може бути використана для дослідження механізмів дії протизапальних біологічно-активних субстанцій та антидотів і визначення ролі редокс-системи у цих процесах.

У розділі також наведено хімічний аналіз біологічних субстанцій, отриманих із різних джерел – харчових грибів і дріжджів («мікс-фактор», а також із низькомолекулярних компонентів молозива (НМК)). Показано, що до складу «мікс-фактора» входять переважно цукри (60%), іншими компонентами є пептиди, амінокислоти (20%), ліпіди (10%), вітаміни B₁, B₂, PP. НМК у більшому ступені містили білки. Зазначено, що препарат «мікс-фактора» сертифікований за ТУУ 10.8-332062207-002:2018, НМК (низькомолекулярні компоненти молозива), отримані в лабораторії НДІ біології.

У другому підрозділі (3.2) висвітлено дослідження впливу «мікс-фактора» та НМК на деякі фізіологічні показники тварин з Cu-індукованим токсикозом.

Показано, що введення тваринам per os «мікс-фактора» (0,05 мл/100 г маси тіла) і НМК (0,1 г/100 г маси тіла) триразово (з інтервалом між введеннями 24 години) тваринам з Cu-індукованим токсикозом

супроводжувалося нормалізацією зниженої маси тіла, показників підвищеної температури тіла, і частково відновленням зниженої працездатності тварин. Також ведення мікс-фактору на тлі Cu-індукованого токсикозу нормалізувало кількість еритроцитів. Тож компоненти «мікс-фактора» мають антитоксичний ефект, а також, як було показано, здатні посилювати гормезисний ефект до іонів міді. Аналогічні зміни отримані автором і при застосуванні НМК. Отже низькомолекулярні компоненти з різних джерел викликали схожі фізіологічні ефекти на моделі інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю, і автор припускає, що їхня дія може бути реалізована через зміну характеристики редокс-системи.

Третій підрозділ (3.3) присвячений дослідженню впливу «мікс-фактора» і НМК на деякі показники про-антиоксидантної системи у тварин після інтоксикації сірчаною кислотою міддю та на тривалість життя експериментальних тварин.

Виявлено, що триразове введення «мікс-фактора» на тлі інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю усували окислювальний стрес, що супроводжувалося зменшенням вмісту гідроперекисів ліпідів в мітохондріях і мембранах ендоплазматичного ретикулюма, а також в сироватці крові і збільшенням активності глутатіонпероксидази у порівнянні з групою тварин з Cu-індукованим токсикозом. Аналогічні зміни зменшення вмісту гідроперекисів ліпідів в мітохондріях і мембранах ендоплазматичного ретикулюма і в сироватці крові отримані і при триразовому веденні низькомолекулярних компонентів молозива. Ці дані можуть вказувати на те, що досліджувані субстанції спричиняли захисний ефект на тварин після інтоксикації сірчаною кислотою міддю. Проте активність глутатіонредуктази мітохондрій не змінювалася. Автором відмічена дозозалежна дія НМК: в малих дозах (0,05 - 0,1 мг / 100 г) проявляється антиоксидантні властивості, у великих дозах низькомолекулярні компоненти молозива (1 мг – 3 мкг / 100 г білка) проявляли прооксидантні властивості.

Цікавим у роботі є дослідження впливу мікс-фактора на тривалість життя експериментальних тварин та їх працездатність у «зрілому» віці. Такі дослідження наразі є актуальними у зв'язку зі збільшенням тривалості життя та необхідністю підтриманням працездатності у похилому віці. Так, у роботі показано, що компоненти «мікс-фактора» усували окислювальний стрес, що виникає в процесі природного старіння. Вживання з питною водою «мікс-фактора» старими тваринами зменшувало вміст гідроперекисів ліпідів в сироватці крові і мітохондріях печінки, збільшувало активність глутатіонпероксидази, здатність тварин виконувати роботу і незначно збільшувало їх тривалість життя. Ці результати ще раз підтверджують участь вільнорадикальних процесів у процесах старіння та доводять, що «мікс – фактор» може розглядатися у якості потенційного геропротектора.

Експериментальну частину роботи завершує обговорення отриманих результатів, де наведено їх аналіз та узагальнення, у стислій формі відображено суть роботи, сформульовано власну гіпотезу про механізм

переходу неспецифічної реакції антиоксидантно-прооксидантної системи до формування специфічних адаптивних метаболічних патернів і прояву антитоксичних функцій. Останній розділ дисертації – висновки, які відповідають поставленим задачам.

4. Висвітлення матеріалів дисертації в авторефераті та опублікованих наукових працях

Основні результати роботи опубліковані у 8 наукових публікаціях, із них у фахових вітчизняних та зарубіжних журналах представлено у 6 статтях. Робота пройшла достатню апробацію на конференціях Всеукраїнського та міжнародного рівнів.

Стиль написання відповідає вимогам наукового викладу, проте слід зауважити на наявність граматичних помилок. Зміст автореферату та публікації в достатній мірі відображають результати та основні положення дисертаційної роботи, оформлення дисертації відповідає затвердженям МОН України вимогам.

Поряд з висловленими вище позитивними характеристиками дисертаційної роботи, є кілька зауважень та питань:

- Не показано зв'язок теми дослідження з державними та галузевими науковими програмами.
- Потребують уточнення методики перорального введення (з водою, їжею або іншим шляхом) щурам низькомолекулярних компонентів «мікс-фактора» та НМК, а також пояснення вибору швидкості бігу тварин, а саме 40 м/хв у третбані.
- Бажано отримати від автора обґрунтування обраної дози сірчаноокислої міді (33% від летальної дози) для викликання Cu-індукованого токсикозу та доз 0,05 мл / 100 г «мікс-фактору» і 0,1 мг / 100 г низькомолекулярних компонентів молозива.
- Ні в описі, ні в схемі експерименту не вказано вік тварин, лише зазначено, що дослідження проводилися на тваринах різного віку.
- Хотілося також почути аргументи щодо послідовності підрозділів дисертації. Можливо підрозділ 3.1.3 з характеристиками «мікс-фактора» та НМК бажано для кращого сприйняття було подати у розділі «Матеріали та методи дослідження».
- Позначення на рис. 3.12 контрольної групи та групи з Cu-токсикозом переплутані.
- Якщо до складу «мікс-фактору» входить більш 60 % цукрів, а НМК містять більше 80 % білкових компонентів, як це враховувалося під час оцінки біологічної активності цих субстанцій? І в чому, на думку автора, проявлялася їх специфічність дії?
- Як автор може пояснити, що у малих дозах (0,05 - 0,1 мг / 100 г) проявляються антиоксидантні властивості НМК, а у великих (1 мг – 3 мкг / 100 г білка) – прооксидантні.

Всі вищезазначені зауваження не применшують позитивного враження від дисертаційної роботи та носять рекомендаційний характер.

5. Загальний висновок

За актуальністю, змістовним розкриттям, науковою новизною, обґрунтованістю положень, висновків і оформленням дисертаційна робота «Дослідження механізмів «відновлення» певних біохімічних показників біологічно активними сполуками після дії токсичних доз іонів міді» відповідає вимогам, що встановлені для дисертацій, поданих на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, п.п. 11, 13, 14 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р., № 567, а її автор, Мохаммад Моршед Аїед Алсардіа, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія.

Офіційний опонент,
професор кафедри анатомії і фізіології людини
імені професора Я.Р. Синельникова
ХНПУ імені Г.С. Сковороди
доцент, кандидат біологічних наук



Т.Є. Комісова

Підпис та
засвідчується за загальним відділом

Комісові Т.Є.



Відгук одержано 25.11.19
Власний секретар Рект.