

ВІДГУК
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Сабадашки Марії Володимирівни "Дія концентрату поліфенольного
комплексу з виноградного вина за радіоіндукованого оксидативно-
нітративного стресу" на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія

Актуальність теми.

Представлена робота присвячена дослідженню біохімічних ефектів дії природного поліфенольного комплексу з виноградного вина на перебіг оксидативно-нітративного стресу у клітинах крові, аорти та коркового шару нирок за умов впливу малих доз іонізуючого опромінення.

У зв'язку з розвитком атомної енергетики, впровадженням в промисловість, науку та медицину методів з використанням іонізуючого випромінювання, дослідження його впливу на організм людини залишається актуальною проблемою сучасності. Тому питання впливу опромінення на живі організми, вивчення закономірності його дії в малих дозах на сьогодні набуває великого значення. Особливо це є актуальним для ряду регіонів, які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. Підвищення радіаційного фону в дозах, які перевищують природній фон, призводить до зростання радіаційного навантаження на людину. Опромінення в малих дозах не призводить до загибелі організму, але здатне модифікувати різні клітинно-тканинні процеси. У результаті дії іонізуючого випромінювання на організм людини в тканинах можуть виникати складні фізичні, хімічні та біологічні процеси. При цьому порушується нормальне протікання біохімічних реакцій та обмін речовин в організмі. В залежності від поглинутої дози випромінювання та індивідуальних особливостей організму, викликані зміни можуть носити зворотний або незворотний характер. При незначних дозах опромінення уражені тканини відновлюються. Але, тривалий вплив доз, які перевищують гранично допустимі межі, може викликати незворотні зміни в окремих органах або у всьому організмі й проявитися в хронічній формі хвороби органів і систем організму. На сьогоднішній день експериментальними і клінічними дослідженнями показано, що при дії іонізуючого випромінювання особливого значення набувають процеси, пов'язані з утворенням активних метаболітів кисню та азоту, зокрема оксиду азоту, оскільки вони при підвищених концентраціях можуть модифікувати біомолекули і призводити до деструктивних змін у клітині та до її загибелі. Відомо, що оксид азоту, який утворюється в надмірних кількостях за патологічних станів виявляє виражену цитотоксичну дію за рахунок утворення пероксинітриту, здатного викликати

деструкцію практично всіх компонентів клітини. Пошкодження клітини є одним з основних механізмів розвитку багатьох патологічних станів, що виникають під дією фізичних, хімічних і біологічних факторів. Тому, дуже важливою задачею є виявлення нових ефективних і нетоксичних протекторів з пролонгованим механізмом дії, використання яких може зменшити негативний вплив іонізуючого опромінення. Пошук таких речовин є найбільш перспективним серед біологічно активних речовин рослинного походження, багато з яких мають антимуtagenні, антиканцерогенні та гепатопротекторні властивості. Дуже перспективну для вивчення групу речовин являють собою природні поліфеноли. Це пов'язано з тим, що фенольні сполуки виявляють широкий спектр фармакологічної активності та відіграють дуже важливу роль в регуляції оксидативного балансу в організмі людини та тварин. Відомо, що виноград культурний є цінним джерелом поліфенолів. Для поліфенолів винограду показані антиоксидантна, імунomodуюча, протизапальна, гіпоглікемічна активності. Тому, з огляду на вищенаведене, визначення впливу поліфенолів виноградного вина на розвиток оксидативно-нітративного стресу за дії іонізуючого опромінення в малих дозах та розробка підходів до корекції його наслідків обумовлює актуальність даної роботи.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими програмами.

Актуальність обраної теми обґрунтовано тим, що вона виконувалась на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка згідно плану науково-дослідної роботи кафедри за темою "Протекторний ефект природного поліфенольного комплексу винограду за умов радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу" (№ держреєстрації 0112U001261) та згідно угоди про творчу та науково-технічну співпрацю між кафедрою біохімії біологічного факультету та Національним інститутом винограду та вина "Магарач", підписаної у 2009 році. Робота була підтримана індивідуальним грантом від Західно-Українського Біомедичного Центру за темою "Radioprotective Effects of Natural Polyphenolic Complexes of Crimean Grape Wine at Oxidative/Nitrative Stress Associated With Low Doses of Ionizing Radiation "(2012-2013 pp.)

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.

Робота ґрунтується на значному за обсягом експериментальному матеріалі, виконана на високому науковому та методичному рівнях. В результаті проведених досліджень автором встановлено достатню кількість нових фактів, важливих для розвитку сучасних уявлень про характер і закономірності ураження органів і тканин малими дозами іонізуючого випромінювання як на клітинному, так і на молекулярному рівні. В роботі вперше проведено комплексне дослідження впливу поліфенольного комплексу

з виноградного вина на вміст 3'-нітротирозинмодифікованих протеїнів, стан системи L-аргінін/NO та активність ензиматичної ланки системи антиоксидантного захисту в периферичній крові, лейкоцитах, тканинах аорти і корковому шарі нирки за умов впливу малих доз іонізуючого опромінення. Автором було встановлено, що концентрат поліфенольного комплексу здатний знижувати утворення вільних радикалів та продуктів ліпопероксидації, нормалізувати активність антиоксидантних ензимів, пригнічувати продукування оксиду азоту, утворення нітрит- і нітрат-аніонів та запобігає накопиченню 3'-нітротирозину. Доведено, що концентрат поліфенольного комплексу проявляє радіопротекторні та антиоксидантні властивості, попереджає виникнення радіоіндукованих порушень та запобігає розвитку оксидативно-нітративного стресу в імунокомпетентних клітинах, тканинах аорти та корковому шарі нирки.

Практичне значення одержаних результатів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що у процесі її виконання отримано результати, які відкривають перспективи розробки препаратів на основі природних біологічно активних речовин, основними діючими компонентами яких є фенольні сполуки і можуть служити основою для науково обґрунтованої фармакологічної корекції виявлених радіоіндукованих порушень тканин і органів. Застосування нових ефективних і нетоксичних протекторів з антиоксидантними властивостями і пролонгованим механізмом дії в якості допоміжних засобів комплексної терапії та профілактики розвитку ушкоджень системи крові, імунної, серцево-судинної та видільної систем зменшить негативний вплив іонізуючого опромінення на організм людини і є перспективним для впровадження в клінічну практику. Розроблено метод отримання концентрату природного поліфенольного комплексу зі сухого червоного виноградного вина й ідентифіковано його якісний і кількісний склад, що може слугувати основою для розробки технології отримання препаратів з радіопротекторними і антиоксидантними властивостями, придатних для широкого застосування і споживання населенням екологічно загрозливих регіонів України.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

Результати проведених автором досліджень повністю викладені у публікаціях. Зміст автореферату відображає структуру і основні положення дисертації. Одержані експериментальні дані широко апробовані. Основні наукові положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: VIII, IX та X Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2012, 2013, 2014); 3-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ялта, 2012);

Конференції молодих вчених, присвяченій 20-річчю Національної академії медичних наук України (Київ, 2013); VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry (Lviv, 2013); Конференції молодих вчених "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології" (Київ, 2013); The 38th FEBS Congress "Mechanism in Biology" (St. Petersburg, Russian Federation, 2013).

За результатами дисертації опубліковано 13 робіт, із яких – 5 статей у провідних фахових журналах України інші 8 публікацій – у збірниках тез і матеріалах наукових конференцій. Зміст автореферату відображає структуру і основні положення дисертації.

Структура дисертації.

Аналізуючи структуру рецензованої роботи, потрібно зазначити, що за своєю актуальністю, сучасним методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною отриманих результатів і обґрунтованістю висновків вона повністю відповідає вимогам ДАК України. Робота написана логічно, сучасною українською мовою, продумано структурована, читається легко.

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел (усього 240 найменувань), проілюстровано 26 рисунками та 20 таблицями і додатками. Дисертаційну роботу загалом викладено на 159 сторінках, із яких основна частина займає – 127 сторінок.

У **Вступі** обґрунтована актуальність розв'язуваної проблеми, сформульовані мета і задачі дослідження, наведена інформація про новизну, і практичну значимість проведеної роботи.

Огляд літератури включає в себе аналіз літературних даних, які достатньо освітлюють вирішувані в дисертаційній роботі питання щодо механізмів розвитку радіоіндукованих уражень, пов'язаних з порушенням окисно-відновних процесів у клітинах. Огляд літератури складається із 4-х підрозділів, в яких узагальнено сучасні погляди на шляхи реалізації ушкоджень, індукованих дією малих доз іонізуючого опромінення. Описано механізми утворення активних форм кисню та оксиду азоту, проаналізовано фактори які сприяють розвитку оксидативно-нітративного стресу і наслідки його ушкоджуючої дії. Наводяться результати дослідження стану процесів перекисного окислення ліпідів і функціонування системи антиоксидантного захисту за умов впливу іонізуючого опромінення різної інтенсивності. В одному із підрозділів розглядаються сучасні підходи та принципи радіопротекції біологічно активними речовинами природного походження та значну увагу приділено розгляду радіопротекторних властивостей поліфенольних сполук із виноградного вина. Достатня кількість посилань,

наведених в огляді літератури, окреслює сучасний стан проблеми і переконує у необхідності та важливості проведення даного дослідження.

У розділі **Матеріали і методи дослідження** представлені використані сучасні біохімічні методи дослідження (визначення активності ензимів, визначення ТБК-ПП та стабільних метаболітів NO), молекулярно-біологічні (метод Вестерн-блот аналізу протеїнів), цитологічні (світлової мікроскопії) та статистичні (метод варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента). Описано метод отримання концентрату поліфенольного комплексу із червоного виноградного вина. Робота виконана на статевозрілих нелінійних щурах (самках) згідно зі "Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв) з дотриманням загальних принципів біоетики у відповідності до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей". Доцільність в застосуванні запропонованих методик та підходів, матеріальне забезпечення, обсяг проведених досліджень відповідає сучасному науковому рівню.

Результати досліджень викладені з належною академічною повнотою і наведенням відповідних малюнків і таблиць.

Згідно до поставлених завдань в роботі докладно описано ефекти впливу концентрату природного поліфенольного комплексу на стан системи L-аргінін/оксид азоту за дії малих доз іонізуючого випромінювання. Було показано, що за дії іонізуючого випромінювання в дозі 10сГр і 30 сГр має місце порушення синтезу оксиду нітрогену (зростає активність NO-синтази і як наслідок підвищується рівень утворення NO, що підтверджується зростанням сумарного вмісту стабільних метаболітів (NO_2^- і NO_3^-) як у периферичній крові, так і у імунокомпетентних клітинах, аорті та нирках щурів. Такі процеси сприяють поглибленню радіоіндукованих уражень за рахунок розвитку нітративного стресу. Показано, що застосування поліфенольного концентрату призводило до нормалізації досліджуваних процесів, модифікуючи радіоіндуковане порушення продукції NO, нітритів та нітратів.

Достатньо детально проаналізовано вплив поліфенолів із виноградного вина на рівень 3'-нітротирозинмодифікованих протеїнів. Аналіз отриманих даних виявив, що ефект впливу малих доз іонізуючого опромінення має свої відмінності і специфіку. Зростання вмісту 3'-нітротирозину виявлено у лейкоцитах і корковому шарі нирки щурів, що підтверджує розвиток нітративного стресу, тоді як в тканинах аорти цей показник був нижче контрольних значень на всіх етапах досліджень. Застосування концентрату поліфенольного комплексу з виноградного вина запобігає накопиченню 3'-нітротирозину у лейкоцитах і корковому шарі нирки щурів. Цікавим є той

факт, що для тканин аорти показано зниження вмісту 3'-нітротирозинмодифікованих протеїнів нижче контрольних значень за умов споживання концентрату поліфенольного комплексу із виноградного вина за умов опромінення на всіх етапах експериментальних досліджень.

Аналіз отриманих даних виявив, що іонізуюче випромінювання призводить до метаболічних порушень в клітинах, які розвиваються за типом оксидативно-нітративного стресу, що зумовлено дисбалансом прооксидантних і антиоксидантних процесів. Крім цього, детально охарактеризовано виявлені різнонаправлені зміни активності ензимів антиоксидантної системи, таких як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза в залежності від терміну дослідження (24, 48, 72 та 168 годин) і від дози опромінення (10сГр та 30 сГр) на фоні зростання рівня токсичних ТБК-позитивних продуктів. Застосування концентрату поліфенольного комплексу призводило до відновлення активності ферментів антиоксидантного захисту до контрольних величин і нормалізації про-антиоксидантної рівноваги, що підтверджується зниженням вмісту ТБК-позитивних продуктів.

Вживання за дії іонізуючого випромінювання концентрату поліфенольного комплексу запобігало накопиченню токсичних продуктів ПОЛ, що підтверджує антиоксидантні властивості поліфенольних компонентів червоного виноградного вина.

Важливо зазначити, що в кожному підрозділі ретельно і логічно розглядаються отримані дані щодо впливу різних доз іонізуючого опромінення на тканинному і органному рівні в залежності від терміну дослідження.

Інтерпретація фактів, отриманих дослідником, є важливим елементом роботи. У даній дисертації їй присвячено розділ **Аналіз та узагальнення результатів досліджень**, в якому подається обговорення основних підсумків роботи, яке є кваліфіковане та достатньо аргументоване. Він викладений на 20 сторінках. Серед розглянутих розділів даної дисертаційної роботи останній, на мій погляд, є особливо вдалим. В ньому аргументовано і логічно проводиться аналіз і порівняльна характеристика великого масиву отриманих даних і даних літератури щодо біохімічних механізмів розвитку оксидативно-нітративного стресу в периферичній крові, лейкоцитах, аорті та нирці в нормі та за умов впливу іонізуючого опромінення в малих дозах. За прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу, який розвивається внаслідок дії ушкоджуючих факторів та накопичення токсичних метаболітів оксидативних та нітративних реакцій показано корегуючий вплив концентрату поліфенольного комплексу із виноградного вина, який можна рекомендувати для профілактики та лікування, зокрема, захворювань крові, серцево-судинної та видільної системи та інших патологій, які супроводжуються оксидативно-нітративним стресом. Особливо

необхідно відмітити, що на основі отриманих власних результатів та аналізу наукової літератури була запропонована узагальнююча схема, на якій представлено біохімічні механізми розвитку радіоіндукованих уражень, пов'язаних з порушенням окисно-відновних процесів у клітинах та ймовірні мішені впливу компонентів концентрату поліфенольного комплексу із виноградного вина.

За результатами дисертаційної роботи Сабадашкою М.В. зроблено 8 узагальнюючих висновків, які логічно випливають із одержаних результатів, науково обґрунтовані, повністю відображають основні етапи і сутність проведеного дослідження. У переважній кількості вони носять констатуючий характер і не містять елементів з'ясування причинно-наслідкових зв'язків отриманих експериментальних даних.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій.

Сформульовані положення, висновки та рекомендації ґрунтуються на експериментальних даних, одержаних з дотриманням стандартних вимог до утримування тварин, на великій кількості випробувань в експерименті і одночасному проведенні вимірів в контрольній групі тварин. Всі експериментальні дані представленої роботи отримані і оброблені автором самостійно. Робота виконана із застосуванням сучасних біохімічних методів досліджень, що повністю відповідає досягненню мети і вирішенню поставлених завдань та дозволило зробити обґрунтовані висновки з отриманих результатів. Коректне використання статистичних методів аналізу отриманої інформації дали можливість автору одержати достовірні результати. Отримані дані в достатній мірі представлені рисунками і таблицями (Додатки), які дають чітку уяву про особливості досліджуваних процесів.

Таким чином, наукові положення і висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими належним чином та значущість змін не викликає застережень.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Під час розгляду дисертаційної роботи виникли ряд зауважень та питань дискусійного характеру. Так:

1. На мій погляд в дисертаційній роботі недостатньо чітко обґрунтовано обрані терміни дослідження за впливу іонізуючого опромінення.

2. Не є зрозумілим, чому робота виконана на самках щурів, тоді як традиційно використовуються самці (у останніх більш стабільний нейрогуморальний стан регуляції).

3. Чітко не сформульовано обрані дози опромінення (10сГр і 30 сГр).

4. В роботі не достатньо наведено посилань на наявність результатів експериментальних досліджень щодо аналогічних препаратів рослинного походження - продуктів переробки винограду в Україні.

5. Що, на думку автора, є причиною, а що є наслідком оксидативно-нітративного стресу в організмі щурів, за умов впливу малих доз іонізуючого випромінення?

Однак, всі зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку. Проблема, яку досліджує автор дисертації, надзвичайно важлива, а одержані нею дані вносять вагомий вклад в з'ясування біохімічних механізмів залучених до виникнення радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу і корегуючого впливу концентрату поліфенольного комплексу із виноградного вина на досліджувані процеси.

Висновок.

Враховуючи все сказане вище, вважаю, що опонована робота Сабадашки М.В. "Дія концентрату поліфенольного комплексу з виноградного вина за радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу" присвячена важливій науковій і практичній проблемі, є завершеною науковою працею, що за актуальністю проблеми, теоретичним рівнем, методичним забезпеченням, науковою новизною та практичним значенням результатів досліджень відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент:

Завідувач НДЛ "Фізико-хімічної біології"
ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Сокур О.В.

Підпис Сокур О.В. завіряю.
Вчений секретар НДЧ
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, к.філол.н.

Щербина Н.Л.