

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Гойванович Наталії Костянтинівни на тему: «**Біохімічні механізми порушень метаболізму в тканинах тварин під впливом афлатоксину В₁ та їх корекція введенням антиоксидантів**», поданої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 — біохімія

Актуальність теми

Проблема зараження мікотоксинами продуктів харчування та кормів, діагностика інтоксикації мікотоксинами, лікування викликаних ними патологічних змін, запобігання інтоксикації, особливо хронічної, є надзвичайно важливою для медицини і ветеринарії. Інтенсивне вивчення мікотоксинів було започатковане у 1960 році з приводу масового отруєння індиків на птахофермах Англії. З того часу ідентифіковано біля 300 мікотоксинів і 350 видів плісень, що їх продукують. Небезпечність цих речовин полягає у тому, що у невеликих дозах вони викликають різноманітні прояви інтоксикації у людей і тварин, що в кінцевому результаті приводить до важкого ураження печінки – цирозу, карциноми, порушень гемостазу (кровоточивості). Як зазначається ВООЗ, розробка гігієнічних критеріїв зараження мікотоксинами продуктів харчування, кормів, і його контроль є одним із важливих завдань.

Однією із найбільш небезпечних є група метаболітів *Aspergillus flavus* – афлатоксинів, серед них афлатоксин В₁ і продукт його оксидації (гідроксилування) - афлатоксин М₁, який утворюється в організмі корови при поїданні зараженого корму, проникає і накопичується у молоці. Доведено, що ці токсини є причиною виникнення цирозу і карциноми печінки. Про механізм дії афлатоксинів відомо, що він полягає у епоксидуванні подвійної зв'язки цитохромом Р-450 мікросомальної системи із наступним зв'язуванням продукту із РНК і блокуванням синтезу білка. Роль оксидативного стресу і активних форм Оксигену у генезі порушень, зумовлених афлатоксином В₁, вивчена недостатньо.

Дисертаційна робота Гойванович Н.К. представляє собою експериментальне дослідження біохімічних механізмів порушень окремих ланок метаболізму у тварин за умов гострої та хронічної інтоксикації афлатоксином В₁ у модельних експериментах на білих щурах. При цьому основна увага звернена на роль оксидативного стресу і порушень в системі антиоксидативного захисту, які призводять до змін у метаболізмі і, відповідно, функції життєво важливих органів. Логічним продовженням є спроба корекції змін введенням антиоксидантів, які включали як відомі препарати (вітамін Е, Е-Селен), так і новий засіб – препарат біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma*. Застосування цих дріжджів мотивується тим, що вони синтезують каротиноїд астаксантин, який проявляє властивості антиоксиданта, а також може виконувати роль сорбента в травному каналі при згодовуванні в якості кормової добавки і сприяти видаленню токсинів із організму.

На основі вищеприведеного вважаю, що тема дисертаційної роботи Н.К.Гойванович «Біохімічні механізми порушень метаболізму в тканинах тварин під впливом афлатоксину В₁ та їх корекція введенням антиоксидантів» є актуальною і має як чисто наукове, так і практичне значення.

Зв'язок теми дисертації з державними або галузевими програмами

Дисертаційна робота виконана в рамках тематики науково-дослідних робіт лабораторії обміну речовин ім. С.З.Гжицького Інституту біології тварин НААН упродовж 2009-2015 рр., НТП 5 «Наукові основи управління мікробіологічними

процесами в технологіях високопродуктивного сільськогосподарського виробництва», завдання «Вивчити біохімічні механізми дії природних токсинів кормів на мікроорганізми рубця і розробити методи зниження їх токсичності» (шифр 05/02-30Ф, № держреєстрації 0111U006137).

Структура дисертації

Дисертаційна робота скомпонована по традиційному плану і відповідає вимогам до кандидатських дисертацій. Робота містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень», «Аналіз результатів досліджень», «Висновки», «Практичні рекомендації», «Список використаних першоджерел», який містить 311 посилань. Матеріал дисертації викладено на 165 сторінках, із них основна частина займає 127 сторінок. Робота містить 22 таблиці і 6 рисунків.

Вступ містить обґрунтування актуальності проведеного дослідження, сформульована мета і завдання, які вирішувались і відповідали поставленій меті. Приведена наукова новизна отриманих результатів, їх практичне значення та інші рубрики, які повинні бути у вступі.

Огляд літератури містить 6 підрозділів, у яких висвітлено аспекти токсичної дії афлатоксинів на організм людини і тварин, метаболізм і біотрансформація цих токсинів в організмі і викликані ними морфологічні і функціональні пошкодження. Розглянуто також умови, які сприяють росту плісень-продуцентів мікотоксинів, основні джерела надходження афлатоксинів в організм, виявлення токсинів у продуктах і кормах і допустимі їх гігієнічні рівні, методи детоксикації мікотоксинів, афлатоксинів зокрема. У огляді, однак, недостатньо висвітлено дані літератури про вплив афлатоксинів на стан прооксидантно-антиоксидантного балансу, що було предметом дослідження у дисертаційній роботі.

У розділі **«Матеріал і методи досліджень»** чітко представлені схема проведення експериментів і методи, які застосовувались для вирішення поставлених завдань. Слід відмітити дуже добре описаний комплекс методів характеристики оксидативного стресу і антиоксидантної системи. Описані також методи визначення активності лактатдегідрогенази і глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, які повинні характеризувати обмін вуглеводів. У порівнянні із набором показників оксидативного стресу вони виглядають скромніше, однак для характеристики окремих ланок метаболізму, як сформульовано у дисертації, вони є цілком адекватні. Більш важливим показником є активність амінотрансфераз, особливо у плазмі крові, яка відображає ушкодження печінки, що характерно для ураження мікотоксинами. Вважаю, що у даному розділі було б доцільно привести дані про властивості препаратів, які використовувались для корекції метаболічних порушень, про що зазначено у зауваженнях.

У розділі **«Результати досліджень»** послідовно і систематично описано вплив афлатоксину В1 (AFB₁) за умов гострої і хронічної інтоксикації на показники оксидативного стресу і активності ряду ферментів у тканинах печінки, мозку, нирок, серця і крові лабораторних щурів, що далі послужило основою для дослідження ефективності застосованих антиоксидантів у запобіганні або корекції виниклих порушень. Встановлено, що AFB₁ зумовлює активацію прооксидантних процесів і зниження рівня активності факторів антиоксидантної системи, а також виявлені особливості впливу AFB₁ при гострій і хронічній інтоксикації. Виявлено, що при гострому отруєнні AFB₁ в нирках спостерігається підвищення активності глутатіонтрансферази, що свідчить про важливе значення нирок у детоксикації AFB₁. Прооксидантна дія AFB₁ проявляється також у пригніченні активності важливих ензимів вуглеводного обміну – лактатдегідрогенази і глюкозо-6-фосфат дегідрогенази. Остання має важливе значення, оскільки служить генератором відновних еквівалентів

(Н іонів), які необхідні для підтримки антиоксидантної системи ферментів. Цікаві результати отримані про активність амінотрансфераз. В той час, як активність АлАТ і АсАТ знижувалась в тканинах органів, у крові їх активність зростала, при цьому АлАТ в більшій мірі. Згідно із канонами клінічної біохімії, це чітко вказує на ураження печінки.

Стосовно корекції токсичного впливу АFB₁ встановлено наступні закономірності.

При щоденному згодовуванні препарату дріжджів *Phaffia rhodozyma* спостерігалось зменшення пошкоджуючої дії АFB₁, що проявлялось у зниженні вмісту продуктів ПОЛ у тканинах, у окремих випадках навіть до номального рівня, і підвищення активності ферментів антиоксидантної системи і концентрації глутатіону. Автор вважає, що така дія препарату дріжджів зумовлена каротиноїдами (астаксантином), які синтезують ці дріжджі і які проявляють антиоксидантні властивості. Не можна, однак, виключити і сорбційні здатності цих мікроорганізмів у травному тракті, особливо при щоденному згодовуванні.

Введення вітаміну Е достовірно і суттєво зменшувало вміст продуктів ПОЛ в органах, найбільш виражено в нирках і серці. Стосовно факторів антиоксидантної системи встановлено, що активність ензимів системи (СОД, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази) і вміст відновленого глутатіону незначно знижувались на 7 добу після введення АFB₁, однак на 14 добу експерименту ці показники різко знижувались. Очевидно, це можна було очікувати, враховуючи одноразове введення вітаміну Е у перший день експерименту без подальшого повторного введення. Дещо кращі результати корекції оксидативного стресу при інтоксикації АFB₁ отримано при застосуванні препарату «Е-Селен». На 7 добу експерименту спостерігалось гальмування процесів ПОЛ і позитивний вплив на показники системи антиоксидантних факторів, а саме: зростання активності глутатіонредуктази і глутатіонтрансферази вище вихідного рівня і збереження початкового значення активності глутатіонпероксидази. На 14 добу експерименту виявлено зниження активності ферментів антиоксидантної системи і вмісту відновленого глутатіону, аналогічно як і при корекції самим вітаміном Е. В цілому із експериментів застосування препаратів вітаміну Е можна зробити висновок, що для запобігання негативним змінам показників оксидативного стресу при інтоксикації АFB₁ необхідно більш часте введення вітамін Е-вмісних препаратів, хоча б один раз у тиждень.

У розділі «Аналіз результатів досліджень» кваліфіковано і достатньо аргументовано проведено обговорення основних підсумків роботи і їх порівняння з даними літератури.

За результатами проведених досліджень сформульовано **9 висновків**, які послідовно відображають етапи роботи, логічно впливають із експериментальних даних і повністю їм відповідають.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень і висновків обумовлена достатньо великою кількістю експериментальних даних, отриманих на великій кількості тварин (140 білих щурів), що дозволило провести статистичний аналіз на високому рівні достовірності. Тварин утримували з дотриманням стандартних вимог та біоетичних принципів поводження з експериментальними тваринами згідно Закону України (2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» (1986). Ступінь обґрунтованості та достовірності результатів не викликає застережень.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

За матеріалами дисертації опубліковано 29 наукових публікацій, серед яких 6 статей у наукових фахових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз,

4 - у зарубіжних наукових виданнях, решта – у наукових збірниках і матеріалах наукових конференцій.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були достатньо повно представлені на 10 національних і міжнародних наукових конференціях, які відбувались у 2010-2014 рр. у Харкові, Дрогобичі, Тернополі, Трускавці, Жешові, Варшаві.

Дискусійні зауваження до дисертації

1. В огляді літератури слабо представлено стан досліджень оксидативного стресу та порушень прооксидантно-антиоксидантної рівноваги при інтоксикації мікотоксинами, тобто те, що означається як аналіз і критика прототипу. Ці дані варто було привести у підрозділі 1.1.2, де розглянуто молекулярні механізми дії афлатоксинів.
2. У роботі вперше використовувався оригінальний препарат біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma*, однак не приведено його характеристик. Варто було привести основні характеристики препарату по типу паспорта речовини у розділі «Матеріали і методи». Дана речовина рекомендується для застосування в якості кормової добавки, тому бажано знати ці дані, щоб оцінити можливості масштабування її виробки для практичного застосування. Для використаних у роботі препаратів вітаміну Е і «Е-Селен» також не приведено даних про їх походження (виробник) і характеристики (концентрація або вміст діючих речовин), що має значення для порівняння їх дії при різних способах введення (пероральне або парентеральне), а також для рекомендацій практичного застосування.
3. Стосовно приведених у авторефераті рекомендацій для практичного застосування звертає увагу значна різниця у дозах вітаміну Е при різних шляхах введення - 100 мг/кг маси при пероральному застосуванні і 2,5 мг/кг маси при парентеральному введенні одночасно із сполукою селену (2,5 мкг/кг маси). У дисертаційній роботі препарат «Е-Селен» застосовували у дозі 0,05 мл/кг маси, тому, якщо не приведена концентрація діючої речовини, неможливо порівняти із дозою, поданою у рекомендаціях. Неясно також, коли і по якому графіку вводили вітамін Е, з лікувальною чи з профілактичною метою. У роботі цей тип антиоксидантів вводили за одну годину до першого введення токсину, тобто профілактично, і надалі упродовж експериментів антиоксиданти не вводили.

Граматичні помилки, описки і незначні редакційні неточності у підборі відповідних по значенню слів були поза увагою рецензента, оскільки вони принципового або суттєвого значення не мають.

Зазначені зауваження мають дискусійний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. Обґрунтована можливість фармакологічної корекції порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу при мікотоксикозі з метою зменшення токсичного впливу цих небезпечних природних токсикантів має важливе практичне значення.

Висновок.

Враховуючи приведені вище міркування, вважаю, що дисертаційна робота «**Біохімічні механізми порушень метаболізму в тканинах тварин під впливом афлатоксину В1 та їх корекція введенням антиоксидантів**» є завершеною науковою працею, яка за актуальністю, методичним рівнем виконання, науковою новизною та практичним значенням відповідає вимогам до дисертацій на ступінь кандидата наук п.п. 11, 12, 13 положення «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор, **Гойванович Наталія Костянтинівна**, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України,
професор

Луцик М.Д.

Підпис доктора біологічних наук Луцика М.Д. засвідчую.
Вчений секретар Інституту біології клітини
НАН України, кандидат біологічних наук



Барська М.Л.