

## УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе  
ФГБОУ ВО «Кубанский  
государственный аграрный  
университет имени И. Т. Трубилина»,  
д-р биол. наук, профессор

  
А. Г. Коцаев  
«19.09.20» 2020 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Флефель Хассан Эльсайед Келяни Мохамеда «Влияние антропогенного загрязнения водоисточников на экспрессию микро РНК (miRNA) у экспериментальных животных», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза в диссертационный совет Д 220.067.02 при ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет»

**Актуальность темы.** Загрязнение водных экосистем тяжелыми металлами является одной из глобальных проблем нашего времени. Во многих водных средах концентрация металлов превышает допустимые уровни. Проблема усугубляется тем, что металлы имеют тенденцию переноситься с отложениями, устойчивы в окружающей среде и могут биоаккумулироваться в пищевой цепи.

Концентрация металлов в отложениях и в долгоживущих организмах отражает накопление в течение определенного периода времени и слабо связана с их содержанием в воде, которое зависит от кратковременного фактора.

Тяжелые металлы, как правило, попадают в водную среду в результате атмосферных осадков, эрозии или вследствие антропогенной деятельности. Токсичные металлы в водных системах обычно остаются либо

нерастворимыми, либо в форме суспензии. Они имеют тенденцию оседать на дне или поглощаться организмами. Концентрация тяжелых металлов в донных отложениях бывает намного выше, чем в воде, что отрицательно сказывается на водных организмах. Донные отложения озер и рек являются чувствительными индикаторами для мониторинга загрязняющих веществ, так как они действуют как поглотители и переносчики загрязнений в водной среде.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформированных в диссертации.**

Основной угрозой от тяжелых металлов на здоровье человека является воздействие свинца, кадмия, ртути и мышьяка. Эти металлы были тщательно изучены, и их влияние на здоровье человека регулярно анализируется международными организациями (ВОЗ). Печень – как активный орган имеет тенденцию накапливать большое количество тяжелых металлов путем связывания с металлотионеином для детоксикации. МикроРНК (miRNA) представляет собой семейство небольших 21–25 нуклеотидных последовательностей, эволюционно консервативных некодирующих генов РНК, которые посттранскрипционно регулируют экспрессию генов-мишеней.

Геном человека, по оценкам, содержит от 1000 до 2000 различных генов miRNA. Предполагается, что у млекопитающих miRNA контролируют активность 30–50 % всех кодирующих белок генов, что делает их ответственными за биогенез, обуславливает их участие во многих критических биологических событиях, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, метаболизм, вирусные инфекции, а также многие заболевания, связанные с нарушением обмена веществ, заболевания различных систем органов и некоторые формы рака.

Растущее количество доказательств показывает, что дисрегуляция miRNA играет важную роль в химически индуцированных формах рака, однако роль miRNA в развитии рака остается относительно неисследованной. Особенно важным представляется получение современных знаний о влиянии различных химических канцерогенов на экспрессию микроРНК.

Различные исследования продемонстрировали связь между измененной экспрессией miRNA и воздействием металлов, таких как мышьяк (As), кадмий (Cd), алюминий (Al) и хром (Cr). В связи с этим, мы провели исследования влияния воды из загрязненных источников на экспрессию микроРНК у экспериментальных животных.

Работа прошла широкую апробацию. Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и положительно оценены на международных научно-практических конференциях.

## **Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы.**

Результаты, представленные в работе, достоверны, получены с помощью современных методов исследования в многократной повторности в аккредитованных лабораториях на оборудовании, соответствующим метрологическим требованиям. Для обработки экспериментальных данных использованы программные средства и методы статистической обработки.

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены: на учёных советах Уральского ГАУ в 2018–2020 гг.; на Всероссийской научно-практической конференции «Достижения ветеринарной науки: от теории к практике» (Екатеринбург, 2018); на Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве» (Ялта, 2019); Координационном совещании по использованию генетических технологий в сельском хозяйстве (Москва, 2019); на Международном симпозиуме «Экология и эволюция: новые горизонты» (Екатеринбург, 2019); Всероссийском съезде зоотехников-селекционеров «Селекция. Генетика. Будущее отечественного животноводства» (Москва, 2019).

Впервые проведено исследование микроРНК (микроРНК-93, микроРНК-221, микроРНК-21a и микроРНК-27a) у экспериментальных животных для оценки загрязнения водных объектов Среднего Урала. Установлено повышенное содержание тяжелых металлов в водных объектах (в воде, донных отложениях, водяных растениях и рыбах). Впервые показана взаимосвязь интенсивного накопления Pb и Cd в организме опытных цыплят и уровнем экспрессии микро РНК-221 в почках, печени, крови. Методику исследования микроРНК можно использовать в качестве биомаркеров при оценке состояния водоемщика, в области ветеринарной медицины для оценки здоровья и благополучия сельскохозяйственных животных, промысловых рыб, а также при прогнозировании развития различных патологий.

Высокая степень достоверности экспериментальных данных обеспечивается использованием классических и современных методов анализа. Достоверность результатов исследований подтверждена статистически с использованием компьютерных программ и определением критерия достоверности по Стьюденту при трех уровнях вероятности.

**Соответствие диссертации и автореферата требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней.**

Диссертация Флефель Хассан Эльсайед Келяни Мохамеда является целостной и завершенной работой, проведенной на высоком методическом и научном уровне с использованием современных методов анализа.

Диссертация и автореферат диссертации написаны в соответствии с нормативами ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». По содержанию, структуре, изложению материала и оформлению диссертация и автореферат диссертации соответствует п. 9 Положения ВАК «О порядке присуждения ученых степеней». Содержание автореферата соответствует научным материалам, представленным в диссертационной работе.

#### **Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.**

Работа выполнена в течение 2017–2020 гг. на кафедре инфекционной и незаразной патологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет».

Диссертационная работа Флефель Хассан Эльсайед Леляни Мохамеда представляет собой законченный, самостоятельный труд. Автором была сформулирована тема исследований, определены цель и задачи, изучено значительное количество источников информации, разработана методика исследований, проведены лабораторные и научно-хозяйственные опыты, полученные материалы подвергнуты статистической обработке и анализу.

На основании этого автор сделал обоснованные выводы и рекомендации производству. Диссертационная работа выполнена под научным руководством академика РАН, доктора биологических наук, профессора Донник Ирины Михайловны.

#### **Содержание диссертации ее завершенность, публикации автора.**

Диссертация изложена на 207 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц, 35 рисунков. Работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, выводы, практические рекомендации, список литературы, включающий в себя 447 источников, в том числе 376 зарубежных авторов.

Диссертация Флефель Хассан Эльсайед Келяни Мохамед состоит из введения, обзора литературы, глав собственных исследований и их обсуждения, заключения, предложений производству, перспектив дальнейшей работы, списка использованной литературы, приложений.

Во «Введение» ясно и четко обоснована актуальность темы; сформулированы цель и задачи исследований; научная новизна; степень разработанности темы; методология и методы исследования; теоретическая и практическая значимость работы; положения, выносимые на защиту, степень

достоверности, апробация и реализация результатов исследований, публикация результатов исследований.

В разделе «Обзор литературы» представлен анализ современного состояния водных водоемов и степень их загрязнения различными ксенобиотиками.

В главе «Материал и методы исследований» приведена общая схема исследований.

В главе «Результаты собственных исследований» представлен материал с результатами лабораторных и научно-хозяйственных исследований.

В снеговых осадках ряда промышленных территорий Среднего Урала повышен уровень тяжелых металлов, особенно свинца. Диапазон содержания Pb составляет 0,42—0,53 мг/л. Наибольшее значение концентрации свинца, зафиксировано в пробах из района Нижней Туры.

В воде, донных отложениях и водных растениях отмечали повышенный уровень концентрации тяжелых металлов во всех исследуемых образцах. Выявлены наибольшие значения Fe, Pb в р. Тура, Ba – в р. Манчаже, Cd, Co, Ni – в р. Позаришке. Наибольшее загрязнение Pb выявлено в реках Позаришка, Манчаж и Уфа, а F – в реках Исеть и Пышма. В образцах установлено превышение значений, рекомендованных ВОЗ и ФАО, для водоисточников (воды, водных растений, донных отложений).

В организме рыб из рек Среднего Урала установлены высокие средние концентрации тяжелых металлов, превышающие ПДК: Pb – в 126 раз в мышечной ткани и в 406 раз в костной; Ni – в 13 раз в мышцах и в 116 раз в костях; Fe – в 1,5 раз в мышцах и 8,5 раз в костной ткани; Cd – в 2 раза в мышцах и в 7 раз в костях.

Наибольшее содержание тяжелых металлов отмечали у ершей (превышение ПДК Ni – в 12 раз в мышцах и в 115 раз в костях; Fe – в 1,5 раз в мышцах и в 14 раз в костях; Cd – в 3 раза в мышцах и в 8 раз в костях; Pb – в 170 раз в мышцах и в 490 раз в костях), что вероятно, обусловлено особенностями питания данного вида.

Уровень экспрессии микроРНК у лабораторных мышей после поения водой из загрязненных водоисточников был неодинаковым в опытной и интактной группах. В крови лабораторных мышей после поения загрязненной водой отмечали повышенный уровень экспрессии микроРНК-93 (2,399), микроРНК-221 (2,959), микроРНК-27a (1678).

В почках уровень экспрессии всех микроРНК был снижен, особенно микроРНК-221 (0,105). В печени выявили высокий уровень экспрессии микроРНК-21a (1120). Определение микроРНК может служить маркером для

оценки уровня негативного воздействия на водоисточники со стороны тяжелых металлов, что позволяет предупредить нежелательное использование их для нужд животноводства и всего сельского хозяйства.

Снижение и повышение уровня экспрессии в генах-мишенях являются детерминантами нарушениями клеточной функции и развития болезни. Нарушение регуляции экспрессии miRNA особенно очевидно в ответах на стимуляцию (в данном случае загрязнение) окружающей среды.

При поении опытных цыплят водой из естественного водоисточника – р. Исеть (1-я опытная группа) и водой с иодидом Cd и ацетатом Pb (2-я опытная группа), выявили отставание их в росте, патологические изменения почек, надпочечников и цирроз печени.

У опытных цыплят в 1-й группе, употребляющих воду из реки Исеть, установлено повышенное содержание Pb в грудных мышцах – на 11 %; Cd – в печени в 6,3 раза, почках – в 4 раза и грудных мышцах – в 3 раза соответственно по сравнению с контрольными.

У цыплят, употребляющих воду с иодидом Cd и ацетатом Pb (2-я опытная группа), накопление тяжелых металлов в организме было значительным выше по сравнению с контрольной птицей: Pb – в печени (в 9 раз), в почках (в 31 раз), в грудных мышцах (в 1,5 раза); Cd – в печени (в 70 раз), в почках (в 33 раза), в грудных мышцах (в 24 раза).

Значения экспрессии микроРНК-221 у цыплят обеих опытных групп по сравнению с контрольной, достоверно отличались: у цыплят, употребляющих воду из р. Исеть, экспрессия микроРНК-221 в печени были в 18 раз выше, чем в контроле, а в почках, наоборот, ниже (в 10 раз). В крови выявили усиление экспрессии в 7 раз по сравнению с интактной птицей.

У цыплят 2-ой опытной группы с повышенным содержанием Pb и Cd в организме установлено снижение в 2 раза активности экспрессии микроРНК-221, по сравнению с контрольными особями, что свидетельствует об токсическом действии тяжелых металлов на регуляцию отдельных микроРНК и экспрессию генов в целом.

Выводы и предложения производству научно аргументированы и полностью обосновывают полученный результат.

Диссертация Флефель Хассан Эльсайед Келяни Мохамеда на тему: «Влияние антропогенного загрязнения водоисточников на экспрессию микроРНК (miRNA) у экспериментальных животных» соответствует паспорту специальности 06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза.

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 – в изданиях, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 1 – в Scopus.

В целом диссертация представляет законченную научную работу. Изложение материала сделано профессиональным языком, в логической последовательности. Автореферат в объеме 23 страницы компьютерного текста включает в себя основные разделы диссертации, представлен в традиционной форме со всеми основными разделами научных исследований и списком опубликованных по теме диссертации работ.

### **Значимость для науки и производства, полученных автором диссертации результатов.**

Проведение регулярного мониторинга водоисточников, особенно вблизи аграрных предприятий. Химический состав поверхностных вод обычно рассматривается для оценки степени загрязнения микроэлементами водной среды. Тем не менее, уровень концентрации элементов в донных отложениях и воде служат показателем качества воды.

Водные растения могут улучшать качество воды в экосистеме путем накопления тяжелых металлов в их органах. Растения могут служить лучшим решением проблемы из-за их способности к абсорбции при более низком уровне концентрации, которая обычно имеет место в окружающей среде, и из-за низких затрат.

Рыбы считаются одним из лучших показателей загрязнения водной экосистемы тяжелыми металлами. Предлагается использовать исследование рыб для выявления негативных факторов загрязнения окружающей среды.

Автором рекомендовано для эффективного контроля появления негативного влияния техногенного загрязнения окружающей среды и водоисточников применять методику определения экспрессии микроРНК у лабораторных животных, которая позволяет на ранних стадиях выявлять нарушения в активности генов и своевременно принимать коррекционные меры.

Коррекция экспрессии микроРНК и химических веществ в окружающей среде делает микроРНК потенциальными биомаркерами для выяснения механизмов и разработки более эффективных стратегий профилактики негативных воздействий на окружающую среду.

**Результаты и выводы диссертации.** Высокая теоретическая и практическая значимость проделанной работы Флефель Хассан Эльсайед Келяни Мохамеда позволяют рекомендовать результаты исследований для

использования в учебном процессе высших и средних учебных заведений при подготовке зооветспециалистов.

Диссертация выполнена на высоком профессиональном и методическом уровне, результаты исследований будут востребованы для практической работы ветеринарных специалистов.

Оценивая в целом диссертационную работу Флефель Хассан Эльсайед Келяни Мохамеда положительно, считаю необходимым указать на имеющиеся в ней отдельные недостатки и высказать пожелания, а на некоторые вопросы получить пояснения:

1. Желательно было бы более подробно осветить в литературном обзоре новые данные о характеристиках и функциях микро РНК, отличие их от матричных РНК.

2. Желательно было бы дать более развернутое описание клинического статуса цыплят из опытных групп, при разной степени воздействия катионов кадмия и катионов свинца.

3. На наш взгляд, несколько излишне подробно описаны методики исследования.

4. Желательно было бы включить в раздел «Материалы и методы» обоснование длительности опыта цыплят из опыта с цыплятами в 60 дней. Ведь известно, что период откорма цыплят-бройлеров составляет менее 42 дней.

Отмеченные недостатки не снижают научных достоинств диссертационной работы, поставленные вопросы имеют больше уточняющий характер, не снижают качество проведенных диссертантом научных исследований, их результатов, основных положений и выводов, рекомендаций по их использованию.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Флефель Хассан Эльсайед Келяни Мохамеда на тему «Влияние антропогенного загрязнения водоисточников на экспрессию микро РНК (miRNA) у экспериментальных животных» является законченной научно-квалифицированной работой, выполненной на достаточном методическом и научном уровне.

По актуальности, научной новизне исследований, практической значимости результатов исследований, достоверности и обоснованности выводов диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Министерства

образования и науки Российской Федерации, утвержденное постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики факультета перерабатывающих технологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина» (протокол № 10 от 16 ноября 2020 г.).

Профессор кафедры биотехнологии,  
биохимии и биофизики ФГБОУ ВО  
«Кубанский государственный аграрный  
университет им. И. Т. Трубилина»,  
д-р вет. наук, профессор

Инна Сергеевна Жолобова

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
аграрный университет им. И. Т. Трубилина»  
e-mail: [biotehnolog@kubsau.ru](mailto:biotehnolog@kubsau.ru)  
8 (861) 221-57-98

Инна Сергеевна Жолобова  
кафедра биотехнологии  
кафедра биохимии и биофизики  
кафедра ветеринарной санитарии, экологии, зоогигиены и ветеринарно-санитарной экспертизы

