

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професорки Фіри Людмили Степанівни, завідувачки кафедри фармації факультету післядипломної освіти Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, на дисертаційну роботу Котика Богдана Івановича «Біохімічні особливості впливу етилтіосульфанілату та вітаміну Е на метаболічні процеси в організмі щурів на тлі дії Cr(VI)», представлену до захисту в разову спеціалізовану вчену раду ДФ 35.368.007 Інституту біології тварин НААН (протокол № 2 від 5 березня 2024р.) на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»

Актуальність теми. Упродовж останніх десятиріч збільшився рівень забруднення навколишнього середовища важкими металами, що становить значну екологічну проблему. Зростання концентрації цих поллютантів у ґрунті, воді, атмосферному повітрі внаслідок антропогенної діяльності супроводжується збільшенням вмісту важких металів у рослинних продуктах та підвищенням ризику їхнього надходження в організм тварин і людини. Значну увагу привертає забруднення довкілля сполуками Хрому, рівень потрапляння якого в компоненти навколишнього середовища з промисловими відходами щорічно становить понад 105 т. Суттєву загрозу для природних екосистем становить шестивалентний Хром (Cr(VI)), який, на відміну від тривалентного, характеризується високим рівнем токсичності та мутагенним впливом на компоненти біоти.

У дослідженнях, проведених під егідою Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), Агентства з охорони навколишнього середовища (ЕРА) і Міжнародного агентства з вивчення ракових захворювань (IARC), встановлено, що Cr(VI) є сильним токсикантом, потужним подразником епітеліальних покривів і канцерогеном щодо людини й тварин. Шкідливу дію шестивалентного хрому значною мірою зумовлюють активні форми кисню (АФО), які утворюються під час відновлення елемента в організмі. Активні форми взаємодіють із клітинними біополімерами, беручи участь у реакціях пероксидного окислення ліпідів та пошкодження біомолекул. Згідно з деякими прогнозами, в майбутньому важкі метали, як загроза екологічному стану

довкілля, можуть вийти на перше місце, випереджаючи в цьому відношенні відходи атомних станцій та органічні антропогенні забруднення.

Відомо, що збільшення інтенсивності утворення АФО в клітинах за певних умов може призводити до розвитку оксидативного стресу, який лежить в основі багатьох захворювань. У зв'язку з потенційною загрозою, яку створюють реакційно здатні метаболіти кисню, у живих організмах функціонує система захисту від дії надлишку АФО, до якої належать низькомолекулярні неензимні антиоксиданти та ензими-антиоксиданти.

В останні роки, актуальним завданням науковців є пошук ефективних антиоксидантних сполук, які здатні запобігати Cr(VI)-індукованому виснаженню системи АОЗ.

Природні сульфуроорганічні біологічно активні сполуки, екстраговані з рослинних організмів, зарекомендували себе як ефективні протектори по відношенню до оксидативного стресу та токсичної дії Cr(VI). Проте, вони характеризуються низькою молекулярною стабільністю, здатністю проявляти побічні та токсичні ефекти у певних дозах та за певних періодів впливу. Доцільним є пошук стабільних аналогів, які максимально ефективно протидіють інтоксикації Cr(VI) та водночас легко засвоюються організмом без ризиків та побічних ефектів. Серед них можна виділити етилтіосульфанілат, який відноситься до тіосульфатів. На відміну від природних аналогів тіосульфати є більш стабільними, характеризуються низьким рівнем токсичності та широким спектром біологічної дії.

Вітамін Е добре відомий як жиророзчинний неензиматичний антиоксидант, який захищає біологічні мембрани від активованих процесів ліпопероксидації, що зумовило його застосування за отруєння біхроматом калію.

Виходячи з вищевказаної актуальності, **метою роботи** було дослідити вплив етилтіосульфанілату та вітаміну Е на гематологічний профіль, стан системи антиоксидантного захисту, ліпідного і протеїнового обміну у крові та тканинах щурів за умов Cr(VI)-індукованого оксидативного стресу, а також

розробити нові підходи для профілактики та корекції токсичних станів, спричинених дією Cr(VI).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота є фрагментом планових науково-дослідних робіт лабораторії біохімії адаптації та онтогенезу тварин Інституту біології тварин НААН відповідно до тематики 35.00.02.04.Ф. ДР №0116U001413 «Вивчити фізіолого-біохімічні механізми дії біологічно активних речовин на метаболічні процеси в організмі тварин».

Дисертант є співвиконавцем вище наведеної теми, ним особисто проведені лабораторні дослідження, представлені у дисертаційній роботі.

Наукова новизна роботи. Вперше встановлено, що ЕТС в дозі 100 мг/кг та вітамін Е в дозі 20 мг/кг не проявляють токсичних ефектів та добре засвоюються організмом. Доведено, що ЕТС окремо та в поєднанні з вітаміном Е здійснює виражений протекторний ефект по відношенню до токсичної дії $K_2Cr_2O_7$. Встановлено, що антиоксидантний ефект ЕТС окремо та у поєднанні з вітаміном Е сприяв зниженню інтенсивності процесів окисної модифікації ліпідів, протеїнів за умов інтоксикації Cr(VI) у плазмі крові та тканинах щурів. Автором виявлено, що досліджувані сполуки активують антиоксидантні резерви у крові та тканинах щурів шляхом підвищення вмісту ВГ, стабілізації активності антиоксидантних ензимів за різних періодів інтоксикації $K_2Cr_2O_7$, а також призводять до зниження рівня акумуляції Хрому в печінці тварин. Вперше з'ясовано, що антиоксидантний ефект досліджуваних сполук проявляється через нормалізацію ліпідного та протеїнового обміну у крові щурів з Cr(VI)-індукованим оксидативним стресом. Дисертант в експерименті виявив стабілізацію гематологічного профілю інтоксикованих щурів за дії досліджуваних сполук, який проявляється у зниженні інтенсивності Cr(VI)-індукованої деградації еритроцитів та лейкоцитів крові лабораторних щурів.

Практичне значення роботи. Отримані результати експериментальних досліджень доводять протекторні властивості ЕТС та вітаміну Е у досліджуваних дозах за умов інтоксикації Cr(VI) та можуть бути використані у

розробці терапевтичних підходів для профілактики виникнення та корекції токсичних станів спричинених дією Cr(VI). Результати експериментальних досліджень впроваджені у навчальний процес на кафедрі біології та хімії факультету здоров'я людини та природничих наук Дрогобицького державного педагогічного університету ім. І. Франка, кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Інституту хімії та хімічних технологій Національного університету «Львівська Політехніка», кафедрі ветеринарної хірургії та репродуктології Державного біотехнологічного університету.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність. Модель експерименту вибрано вдало. Проаналізовано дані 15 груп тварин, які були поділені для досліджень в два етапи. Основні наукові положення, сформульовані автором, повністю відповідають меті та завданням дослідження.

Дисертаційна робота характеризується послідовним викладенням матеріалу, використанням сучасних методів статистичного аналізу, обговоренням основних механізмів та наявністю достатньої кількості посилань на джерела інформації, що були використані. Таким чином, наукові положення, висновки та рекомендації повністю ґрунтуються на одержаних результатах, логічно пов'язані із сутністю роботи, підтверджені результатами статистичної обробки та аргументовані.

Ключові положення та результати дисертаційної роботи були широко представлені на вітчизняних та закордонних конгресах, здійснено впровадження одержаних результатів у науково-навчальний процес ряду профільних кафедр ЗВО України.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій. За темою дисертації опубліковано 7 наукових статей (4 статті у виданнях, які індексуються у міжнародних наукометричних базах Scopus / Web of Science та 3 статті у фахових журналах категорії Б), 15 тез доповідей на вітчизняних, міжнародних та закордонних наукових конференціях, конгресах, форумах. Результати досліджень та основні

положення дисертації були представлені на багатьох міжнародних симпозиумах та конференціях.

Структура, зміст і оформлення дисертації. Дисертаційна робота Котика Б.І. відповідає вимогам Наказу МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12 січня 2017 року (зі змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки України № 759 від 31.05.2019 р.). Дисертація викладена на 214 сторінках друкованого тексту та проілюстрована 11 рисунками та 22 таблицями. До складу дисертації входять наступні розділи: «Анотація», «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаної літератури», «Додаток А», «Додаток Б». До списку літератури входить 325 джерел.

У вступі обґрунтовано актуальність теми досліджень, сформульовано мету і завдання, визначено об'єкти та предмет досліджень, наведено основні наукові результати, їх новизну та практичну значимість, відомості про впровадження та апробацію результатів роботи, а також її структуру.

У першому розділі (огляді літератури) дисертантом наведено аналіз наукових літературних джерел щодо розповсюдження хрому в навколишньому середовищі, а також описані порушення метаболічних процесів за дії Cr(VI). Автор звертає увагу на захисні системи організму, зокрема, на антиоксидантну. Один з підрозділів огляду літератури присвячений впливу Cr(VI) на гематологічний профіль, так як при взаємодії Cr(V)/Cr(IV) з гемоглобіном, формуються стабільні нерозчинні комплекси, які зберігаються в еритроциті протягом усього життєвого циклу і тим самим ускладнюють процеси транспортування O₂ та CO₂. Це призводить до зниження вмісту еритроцитів, лейкоцитів, гемоглобіну, а також до порушення корпускулярних параметрів гемоглобіну у крові лабораторних щурів. Особливу увагу звертає автор на особливості ліпідного та протеїнового обміну в організмі за дії Cr(VI).

Котик Б.І. дуже детально і чітко описує доцільність використання естерів тіосульфокислот та вітаміну Е за умов ураження організму підвищеними дозами хрому. Етилтіосульфанілат (ЕТС) є представником класу сполук

тіосульфатів, який як і вітамін Е проявляє антиоксидантні властивості, що і наводить автор у підрозділі огляду літератури.

У другому розділі дисертант наводить дизайн досліджень, які проведені на лабораторних щурах-самцях лінії *Wistar*. Лабораторним тваринам було забезпечено постійний вільний доступ до їжі та води. Усі маніпуляції з лабораторними тваринами виконувалися з дотриманням вказівок «Європейської конвенції про захист лабораторних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001). Дозвіл на проведення досліджень отримано від комісії з біоетики Інституту біології тварин НААН м. Львова (протокол № 80, 124). Відповідно до поставлених завдань експериментальна частина дисертаційної роботи була поділена на 2 серії досліджень.

Cr(VI)-індукований оксидативний стрес у лабораторних щурів моделювали шляхом внутрішньоочеревинного введення розчину біхромату калію. У даному розділі дисертант детально описує використані ним досліджувані сполуки, а також наводить методи біохімічних та гематологічних досліджень. Деякі з наведених методів дослідження є достатньо відомими і можна було б обмежитись тільки посиланнями на них.

Отримані результати піддавались статистичній обробці з використанням методу ANOVA.

Розділ 3 присвячений власним експериментальним дослідженням. У підрозділі 3.1.1 автор наводить результати досліджень продуктів ліпопероксидації та окисної модифікації протеїнів, а також показники стану антиоксидантної системи організму та вплив на них етилтіосульфанілату після 7 та 14 денного отруєння сполуками хрому. Показано зниження інтенсивності процесів ПОЛ та ОМП за цих умов. В еритроцитах та нирках відмічено активацію СОД та КАТ, у печінці зареєстровано зниження їх активності. Відзначено компенсаторну активацію глутатіонової ланки АОЗ у крові щурів за 7-ми добової дії Cr(VI) з наступною достовірною інактивацією після 14-ти добової токсичності. Використаний ЕТС позитивно вплинув на дані показники.

У наступному підрозділі автор показав, що 7-ми та 14-ти добовий Cr(VI)-індукований оксидативний стрес характеризується гіперліпідемічним ефектом за рахунок достовірного підвищення рівня загальних ліпідів та холестеролу у крові тварин.

Інтоксикація Cr(VI) призводила до порушень відсоткового співвідношення класів ліпідів за рахунок достовірного підвищення вмісту триацилгліцеролів та достовірного зниження неестерифікованого холестеролу у плазмі крові тварин за обох періодів інтоксикації. Попереднє введення в організм ЕТС у дозі 100 мг/кг виявилось неефективним для даного класу сполук.

Етилтіосульфанілат та вітамін Е спричинили перерозподіл у певних класах фосфоліпідів плазми крові щурів. Дія ЕТС призводила до незначного, проте достовірного зниження вмісту фосфатидилхоліну у плазмі крові щурів.

Підрозділ 3.1.3 включає дослідження гематологічних показників, які достовірно знижуються після обох періодів інтоксикації. Попередній вплив ЕТС частково компенсував 14-ти добову Cr(VI)-індуковану токсичність за рахунок нормалізації кількості еритроцитів.

Підрозділ 3.1 завершується дослідженнями показників протеїнового обміну в умовах інтоксикації хромом та вплив на них ЕТС. Показано порушення в активності амінотрансфераз, лужної фосфатази та вмісту загального протеїну.

Розділ 3.2. присвячений впливу етилтіосульфанілату в поєднанні з вітаміном Е на метаболічні процеси в організмі щурів за умов токсичної дії Cr(VI).

Поєднаний вплив вітаміну Е та ЕТС сприяв достовірному зниженню рівня ГПЛ, ТБК-активних продуктів та КГП за умов 14-ти добової Cr(VI) токсичності в крові та досліджуваних тканинах, а також стимуляції СОД активності еритроцитів та КАТ активності. Дія вітаміну Е окремо та у поєднанні з ЕТС сприяла достовірній активації глутатіонової ланки АОЗ шляхом стимуляції активності ГП в еритроцитах та підвищення вмісту ВГ у еритроцитах та печінці щурів.

Поєднаний вплив вітаміну Е та ЕТС частково компенсував 14-ти добові Cr(VI)-індуковані порушення ліпідного обміну за рахунок попередження зниження вмісту фосфоліпідів та запобігання підвищення рівня НЕЖК у плазмі крові тварин.

Інтоксикація хромом супроводжувалася перерозподілом класів фосфоліпідів у плазмі крові тварин. Вітамін Е та ЕТС знижували відсоткове підвищення концентрації ФК як через 7, так і через 14 днів інтоксикації Cr(VI).

Токсична дія Cr(VI) призводила до порушення гомеостазу гематологічних показників, одночасне застосування досліджуваних засобів сприяло зниженню негативного ефекту від застосування хрому, що призводило до нормалізації числа лейкоцитів у крові тварин.

Поєднана дія вітаміну Е та ЕТС сприяла відновленню показників протеїнового обміну, зокрема підвищувався вміст загального протеїну, а також знижувалась активність амінотрансфераз та лужної фосфатази.

Попередній ефект ЕТС окремо або у поєднанні з вітаміном Е сприяв достовірному зниженню рівня акумуляції Хрому у печінці щурів.

Розділ 4 присвячений аналізу та обговоренню результатів досліджень. Він займає 30 сторінок, написаний грамотно і чітко.

Котик Б.І. з отриманих експериментальних результатів зробив 7 висновків, які адекватні поставленій меті та відповідають завданням, що були сформульовані на початку дослідження.

Відсутність (наявність) порушень плагіату. За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертаційної роботи Котика Богдана Івановича на тему: «Біохімічні особливості впливу етилтіосульфанілату та вітаміну Е на метаболічні процеси в організмі щурів на тлі дії Cr(VI)», не було виявлено ознак плагіату, самоплагіату, фабрикації та фальсифікації.

Зауваження і пропозиції. Робота Котика Б.І. містить значний фактичний матеріал, виконана із застосуванням сучасних методів аналізу, висновки автора ґрунтуються на достовірному фактичному матеріалі.

Проте, поряд з позитивною характеристикою дисертаційної роботи є ряд зауважень та пропозицій.

1. Огляд літератури написаний грамотно, чітко, проте у кінці цього розділу немає висновку щодо доцільності виконання даного дослідження.

2. У розділі 2 «Матеріал та методи дослідження» недоцільно детально описувати загальновідомі методи дослідження. Досить обмежитися посиланням на них, або навести тільки принципи методів.

3. У розділі власних досліджень автор у кожному заголовку підрозділу наводить дози досліджуваних засобів. На нашу думку, це недоречно, так як дози наведені у 2 розділі, де дисертант описує дизайн експерименту.

4. Підрозділ 3.13 займає 2 сторінки. Недоцільно давати такий підрозділ, його бажано об'єднати із наступним або попереднім підрозділом.

5. Деякі таблиці перевантажені цифровим матеріалом, їх було б доцільно перенести у розділ «Додатки». Наприклад, таблиця 3.14, 3.16, 3.19 і т.д.

6. Розділ «Аналіз і обговорення результатів досліджень» складає 30 сторінок, що надто багато для дисертаційної роботи такого рівня. На нашу думку, його можна було б скоротити за рахунок загальновідомого матеріалу, який наводить автор. Наприклад, описує біологічно роль амінотрансфераз, вітаміну Е і т.д.

7. У роботі зустрічаються невдалі вирази, русизми, орфографічні помилки.

Проте, вказані зауваження не мають принципового характеру і не впливають на наукову, практичну значимість роботи і на загальну позитивну оцінку дисертації.

У порядку проведення наукової дискусії вважаю доцільним, щоб дисертант відповів на такі запитання:

1. Які на вашу думку основні механізми дії ЕТС залучені в регуляції системи про/антиоксидантного захисту в клітинах лабораторних щурів за умов оксидативного стресу?

2. У підрозділі 1.3 «Огляду літератури» ви зазначаєте, що тіосульфони, представником яких є ЕТС, характеризується нижчим рівнем токсичності у порівнянні зі своїми природними аналогами та належать до сполук IV класу

токсичності (малотоксичні сполуки). Прошу вказати до якого класу токсичності відносять саме природні аналоги ЕТС?

3. У підрозділі 3.13 «Результатів досліджень» вами встановлено, що ЕТС та вітамін Е знижують рівень акумуляції Хрому у печінці щурів, яким вводили біхромат калію. Чому ви обрали печінку для дослідження та чи проводили визначення вмісту хрому в інших органах чи тканинах?

Висновок про відповідність дисертації, що пред'являються до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії. Розглянувши дисертацію Котика Богдана Івановича на тему «Біохімічні особливості впливу етилтіосульфанілату та вітаміну Е на метаболічні процеси в організмі щурів на тлі дії Cr(VI)» та наукові праці, в яких висвітлені основні наукові результати, вважаю, що робота є актуальним і закінченим науковим дослідженням, у якому одержані нові науково обгрунтовані результати, використана з використанням сучасних методів аналізу, має наукову новизну та практичну значимість. У роботі відсутні порушення академічної доброчесності.

Отже, дисертаційна робота повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукового ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою КМУ від 12 січня 2022 року №44, з урахуванням змін, вказаних у постанові КМУ від 19 травня 2023 року № 502, а її автор, Котик Богдан Іванович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія».

Офіційний опонент:

Завідувачка кафедри фармації факультету післядипломної освіти, професорка кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України доктор біологічних наук, професорка



завіряю
Ірина Іванівна
Завідувачка ректора з кадрових питань
Тернопільського національного
медичного університету

ЛЮДМИЛА ФІРА