

Голові разової спеціалізованої  
вченої ради Харківського  
національного університету  
імені В. Н. Каразіна доценту  
Володимиру БЕРЕСТУ  
майдан Свободи 4,  
м. Харків, 61022

### **Відгук**

офіційного опонента, професора кафедри хімії та методики її навчання Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка, доктора біологічних наук, професора Столяр Оксани Борисівни на дисертаційну роботу Акжигітова Рустама Анвяровича «Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»

**1. Обґрунтування вибору теми дослідження.** Організм протягом свого життя піддається впливу складних поєднань хімічних факторів, що постійно змінюються, у поєднанні з іншими стресорами та реагують на них залежно від життєвого статусу та сформованих адаптацій. Необхідність враховувати мінливість та багатогранність цього поєднання внутрішніх та зовнішніх факторів для оцінки зв'язку між несприятливим впливом та очікуваними наслідками у конкретному організмі на певному етапі свого розвитку призвела до створення концепції експосоми/еко-експосоми та вимагає розробки проксі, тобто відносно простих хімічних і біологічних підходів, які можна використовувати для інтегральної оцінки певного впливу (Scholz et al., Environ Toxicol Chem. 2022).

Заявлена тема дисертації аспіранта Рустама Акжигітова відповідає саме таким вимогам оцінки токсичності іонів міді для організму ссавців. Мідь є есенціальним мікроелементом для всіх живих організмів, причому вона погано виводиться з організму порівняно з цинку, що створює небезпеку отруєння при перевищенні рівня надходження, дисбалансі з цинком та магнієм та/або послабленні детоксикаційних потужностей організму. Актуальною залишається антропогенна загроза забруднення середовища солями міді в результаті металовидобувної активності, індустріального та сільськогосподарського виробництва, неконтрольованого використання побутової хімії та харчових доданків.

На наш час добре відомі молекулярні події, пов'язані із акцептуванням, транспортом та підтриманням редокс стану міді в організмі. Мідь є важливим кофактором багатьох металопротеїнів, пов'язаних з редокс процесами, у яких змінює ступінь окиснення ( $\text{Cu}^{+1}/\text{Cu}^{+2}$ ). Завдяки спорідненості  $\text{Cu}^{+}$  до тіолових і тіоетерних груп цистеїну та метіоніну та  $\text{Cu}^{2+}$  до кисневих або імідазольних груп аспарагінової та глутамінової кислот або гістидину мідь може легко зв'язуватися з високою спорідненістю з різними неспецифічними протеїнами, визначаючи їхні структурні стани та функції в біологічних системах, а також викликаючи можливі токсичні ефекти, зокрема каталізувати утворення високо реакційно здатних активних форм кисню, зокрема гідроксильного радикалу, здатного викликати окисні пошкодження біомолекул. Було проведено багато досліджень біохімічних функцій міді на тваринах і людях, щоб створити багату базу даних придатних для моделювання співвідношення доза-відповідь. При цьому, дослідженню металотіонеїнів як акцепторів міді у вищих тварин не приділяється достатньо уваги, оскільки головним їх фізіологічним металом є цинк. При цьому, дослідження токсичності міді та роль і ній металотіонеїнів у контексті експозомі, та, власне, у мультистресорному впливі на ссавців найбільш системно та послідовно

досліджується у НДІ Біології ХНУ ім. Каразіна під керівництвом професора Анатолія Божкова. У дисертації розглядаються можливі стратегії моделювання доза-реакція, залежно від вікових особливостей організму та у порівнянні з етанолом, як іншим оксидантом та стимулятором фіброзу. Застосована модель на різних вікових стадіях додає до розуміння того, чи можна ефективно використовувати існуючі дані про токсичність надлишку або дефіциту міді для визначення меж гомеостатичного діапазону у ссавців.

Тому тема роботи, яка анонсує вивчення адаптивних процесів у організмі щурів за мідь- та етанол стимульованого фіброзу печінки має наукову новизну та спрямована на перспективну практичну мету пошуку ефективних шляхів корекції токсичності з врахуванням особливостей адаптивного потенціалу організму.

**2. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому і оформлення.** Дисертація складається з анотацій, вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел та одного додатку. Загальний обсяг роботи складає 148 сторінок друкованого тексту: 118 сторінок основного тексту, 35 рисунків, 5 таблиць, списку використаних джерел із 139 найменувань.

У *вступі* обґрунтовано актуальність дослідження з'ясуванням ефективності металотіонеїнів у якості депо для міді та забезпеченням її іонами численних клітинних купрум-ензимів за підвищеного вмісту у клітинах, тобто пошуку балансу між хелатуванням та забезпеченням мідь-залежного редокс балансу. У цьому контексті логічним є запропоноване використання моделі мідь-індукованого фіброзу, особливості якого відрізняються залежно від вікової категорії організму. Цим обґрунтуванням автор слушно підкреслює наступність щодо методології дослідження напрацьованої у науковому колективі та доводить доцільність апробування біологічно активних

компонентів різної природи, які можуть підвищувати адаптивний потенціал організму.

Дисертант коректно формулює мету і задачі, об'єкт і предмет дослідження. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

У *першому розділі* дисертант використовує сучасну наукову літературу щодо аргументації моделі дослідження впливу іонів купруму. Фіброз печінки розглядається як адаптація до токсичного фактору середовища, яка запобігає втраті печінкою функціональної активності повністю, а організму дозволяє зберегти працездатний гомеостаз. Автор формулює гіпотезу про процес зупинки фіброгенезу залежно від концентрації купруму у тканині. Дисертант характеризує молекулярні мішені купруму у клітинах та їх очікувані особливості на тлі зниження адаптивного потенціалу. Окрема увага приділяється металотіонеїнам як металодепонувальним протеїнам та індукції їх експресії. Обґрунтовується порівняльна доцільність використання купруму та етанолу як провокаторів гострої та хронічної токсичності. Загалом, зміст розділу свідчить, що автор добре орієнтується у науковій літературі та уміло систематизує інформацію щодо поєднання зовнішніх та внутрішніх чинників у формуванні адаптивної відповіді організму на вплив пошкоджуючих чинників.

У *другому розділі* подається детальне обґрунтування обраних умов експерименту на підставі морфологічних показників, зокрема гепато-соматичного індексу печінки, детальні дизайни маніпуляцій, схеми експериментів, що стосовно модельних схем особливо важливо для верифікації результатів. Опис використаних методик не викликає заперечень. Особливого схвалення заслуговує використання програмного забезпечення Microsoft Office 365, що сприяло візуалізації даних.

У *третьому розділі* подано результати власного дослідження розподілу міді між компартментами клітин залежно від експериментальної моделі та

отримано важливі результати щодо відповіді на повторні впливи на тлі попереднього режиму адаптації. Автор слушно зауважує, що у реальному житті така ситуація тривалого чи періодичного впливу негативного фактору є реальною та, користуючись сучасною термінологією, у екотоксикології, залежно від сили впливу та детоксикаційної здатності організму, може призвести до різних кінцевих несприятливих шляхів (adverse outcome pathways (AOP)). Автор припускає, що саме металотіонеїни є тими низькомолекулярними протеїнами тканини, які беруть участь у формуванні стійкості у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки та досліджує їх для перевірки гіпотези за допомогою методу мас-спектрометрії. З поданих результатів видно, що рівень апопротеїнів та їх частково метальованих форм (6,2-6,5 кДа) відрізняється у двох вікових категорій тварин та залежно від етапу експерименту. Для доказової бази важливим стало дослідження включення міді у низькомолекулярні протеїни цитозолу за умов *in vitro*. У обговоренні результатів дисертант апіорі стверджує, що металотіонеїни зв'язують 7 іонів міді (II) на молекулу. Це твердження, хоч і помилкове, але додає аргументів до відомого дослідження Chen et al (1996, *Biochem J.* doi: 10.1042/bj3170395), у якому доводиться, що зв'язування 12 та/або 20 іонів міді (I) на молекулу металотіонеїнів, яке відоме для одновалентних металів у гомогенних кластерах, є менш стабільним, ніж 7 Cu(I)/молекула. Це переконливо довели результати модельного експерименту, у якому досліджували утворення комплексів іонів міді з протеїнами у низькомолекулярній фракції цитозоля печінки у молодих адаптованих *in vivo* до міді щурів в умовах *in vitro*. Результати говорять на користь некооперативного зв'язування міді з металотіонеїнами та її розподілу між іншими численними шаперонами та мідь-залежними протеїнами. Важливим доказом токсичності міді є типове зменшення аконітазної активності, як

похідної від наявності залізо-сіркових кластерів, вірогідність якої проте повинна бути доведена більшим обсягом статистичних даних.

Аналіз ензимів глутатіон-асоційованого антиоксидантного захисту показав вікові відмінності їх активності та реактивності за впливу міді у мітохондріальній фракції у відповідності до посилення проявів процесів ліпопероксидації у мітохондріях та у сироватці крові.

У підрозділах 3.1.6. та 3.1.6. було подано порівняння динаміки реакції організму на вплив етанолу залежно від віку щурів з використанням низки добре верифікованих біохімічних, морфологічних та фізіологічних маркерів, що посилює аргументацію особливостей адаптації залежно від віку.

У підрозділі 3.2 дисертант аргументує доречність використання біологічно активних сполук різної природи для детоксикації іонів міді та особливості їх дії залежно від вікових адаптацій тварин. Використання компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Sacharamirses cerevisiae* у корекції життєдіяльності набуло поширення у останні роки. Тому особливо важливо верифікувати його на нових моделях. Дисертант довів, що дія цих композитів на виживання молодих та старих тварин після введення летальної дози іонів міді мала U-подібний характер з найбільшим «захисним» ефектом при введенні розчину гідролізату грибів у дозі концентрату 0,05 мл/100 г маси тіла. Моделювання впливу однокомпонентного чинника було здійснено з використанням вітаміну А (ретинол ацетату) за схемою, обґрунтованою попередніми дослідженнями в НДІ Біології ХНУ ім. Каразіна. Отримано важливі результати, які свідчать про відсутність позитивного ефекту у молодих щурів та потребують подальшого поглибленого дослідження.

Аналіз отриманих результатів здійснювався поетапно та використовувався як підґрунтя для планування наступної серії експерименту. У підсумку до роботи автор повертається до аналізу єдності 4 базових принципів структурно-функціональної організації біосистем (Рис. 3.25) в

контексті зв'язку з вік-залежними особливостями адаптивного потенціалу при дії токсичного фактора середовища та біологічно активних сполук, де елементами зокрема є принципи ієрархічності, поліфункціональності молекул, біологічної пам'яті.

Автор формулює шість **висновків**, які загалом відображають застосовані моделі експерименту та сутність отриманих результатів і відповідають поставленим задачам.

*Список використаних джерел* свідчить про обізнаність автора з фундаментальними дослідженнями останніх років у сфері функціонування металотіонеїнів вищих хребетних (зокрема роботи Maret et al), вікові та видові особливості системи антиоксидантного захисту, принципи токсичності міді, тощо, та про коректність їх цитування.

Дисертація є завершеною науковою працею, її оформлення відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

### **3. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна на базі НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна згідно плану науково-дослідної роботи кафедри.

### **4. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Дисертація виконана на

достатньому обсязі експериментального матеріалу із дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, забезпеченням адекватних контролів, використанням методів біохімічного та морфометричного аналізу, які адекватні меті та задачам роботи та інформативні. Результати досліджень статистично опрацьовані. Наукові положення обґрунтовані, висновки відповідають поставленим задачам та змісту роботи і повністю відображають результати.

## **5. Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна.**

Основні наукові результати та висновки дисертації пройшли апробацію під час міжнародних наукових конференцій та знайшли відображення в публікаціях у фахових та міжнародних наукових виданнях. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 8 наукових праць, серед яких: 1 публікація у міжнародній конференції та 7 публікації у міжнародних виданнях, які входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science.

Постановка експерименту та формування доказової бази у дисертації відповідають парадігмі експозиції та уявленням про різні кінцеві несприятливі шляхи (АОР). Такий підхід дозволив селективно визначити залежність детоксикаційної здатності щодо міді та етанолу у щурів з використанням біохімічних маркерів. У дисертації застосовано метод мас-спектрометрії фракції низькомолекулярних протеїнів цитозолу печінки щурів, який дозволив встановити важливі стехіометричні особливості зв'язування ними іонів міді. Обґрунтовано відмінність між віковими групами щурів у готротоксичній та хронічній реактивності на вплив іонів міді на підставі відмінності у вихідному рівні металотіонеїнів. Додатково, із застосуванням експозиції до етанолу, підтверджено різну здатність адаптації вікових категорій. Відтак, отримані результати свідчать про залежність у виборі стратегії адаптації організму та його адаптивного потенціалу від початкового



стану систем організму та доречність використання аналізу металотіонеїнів для його оцінки.

## **6. Практичне значення одержаних результатів.**

Практична значимість дослідження автора полягає у виявленні здатності компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae* для корекції гостро-продовженої токсичності іонів купруму у ссавців. Зроблені важливі висновки щодо перспективності вітаміну А як біологічно активної добавки за токсикозу.

Цінність висновків і результатів досліджень автора доводиться їх впровадженням при викладанні курсів, таких як «Загальна біотехнологія», «Молекулярна біологія», «Основи біоінженерії» на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, а також під час виконання бакалаврських наукових робіт.

## **7. Дотримання академічної доброчесності.**

За результатами аналізу дисертаційної роботи та публікацій автора порушення академічної доброчесності не виявлено. Елементи фальсифікації чи фабрикації тексту в роботі відсутні.

## **8. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.**

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є ряд питань дискусійного характеру та зауважень до оформлення.

1. Щодо назви роботи видається коректніше сформулювати «Роль мідьзв'язуючих білків при формуванні індукованої резистентності до іонів міді», а не «вплив»;

2. Щодо стехіометрії зв'язування металів з металотіонеїнами: У теоретичному обґрунтуванні не вистачає конкретних даних щодо стехіометрії

і констант зв'язування купруму з металотіонеїнами хребетних тварин. Зокрема цитована робота №21 (Chatterjee et al) стосується металотіонеїнів мікроорганізмів, причому філогенетичні відмінності у доменній структурі та спорідненості цих протеїнів до металів істотно відрізняються. Крім того, варто було назвати природу функціональних груп, які хелатують іони купруму I та II у біомолекулах. Щодо посилання №60 (Jayawardena et al., 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.137>), слід відзначити, що схему подано для іонів цинку (II), а не для міді (I). У рис 3.2. не враховано, що металотіонеїни зв'язують одновалентну мідь, максимально у кількості 12 іонів на молекулу (6+6 у двох кластерах). На с 74 автор апріорі формулює, що «незважаючи на свою спорідненість до іонів двовалентної міді, металотіонеїни (MT) не проявляють жорсткої специфічності і не «прагнуть» зв'язати максимум (7 іонів для цього елемента).

3. Не можна погодитись з твердженням (с. 30), що «вибір етанолу полягав ще й в тому, що з одного боку він може виступати у якості ендогенного з'єднання, яке синтезується в організмі як побічний продукт вуглеводного обміну [83]...». Насправді лише за участі піруватдекарбоксілази у дріжджів та модифікованої піруватдегідрогенази у зябрах карася (*Carassius carassius*) відбувається біосинтез етанолу у процесі дихотомічного розпаду глюкози. У посиланні № 83 (Wilson et al. Ethanol metabolism.....2020) не згадується про синтез етанолу.

4. Некоректні вирази, недбалості у пунктуації, потребує уточнення. Наприклад, с 31 - розчин 5-водної сірчаної кислоти міді (Україна) – слід вказати, яка фірма (Синбіас ?), який клас чистоти? Неузгоджені закінчення: С 35, с 59; Нумерація розділів 3.2 чи 3.3; Автор вживає замість «сполуки» «з'єднання», що є калькою при перекладі (compounds); Формулювання підзаголовків 3.16, 3.1.7 – коректно не «на деякі біохімічні/фізіологічні маркерні показники», а «за деякими біохімічними/фізіологічними маркерними показниками»; С 89 не

вміст, а активність аконітази; С 101 «відмінностям у динаміці вмісту креатиніну є місто» – насправді «місце»; С 111 «високих токсичний сполук»

5. Зауваження до подання методів та результатів.

2.4.3. не вказано точність методу визначення концентрації міді, що важливо, особливо для аналізу фракції низькомолекулярних протеїнів; На рис 2.6 варто по осі абсцис указувати не номер пробірки, а характеристику  $V_e/V_0$ ; Щодо природи мідь-протеїнів варто було реєструвати їх спектр в ультрафіолетовому діапазоні для ідентифікації типових особливостей метал-тіолатних кластерів, для яких пік у купрум-формі має дальній зсув порівняно з цинк-формою; Г). Слід було обґрунтувати, чому активності ензимів та ліпідопероксидації визначали саме у мітохондріальній фракції, тоді як металотіонеїни - це переважно цитозольні протеїни. Варто також прокоментувати використання як маркера мітохондріальної, а не цитозольної ізоформи аконітази, особливо у контексті того, що залізо-сіркові кластери є первинними внутрішньоклітинними мішенями токсичності міді (Macomber and Imlay, 2009. doi: 10.1073/pnas.0812808106).

Зауваження, які виникли до рецензованої роботи, носять здебільшого дискусійний характер та не применшують наукової цінності отриманих результатів дисертанта Рустама Акжигітова.

В цілому дисертація Рустама Акжигітова є завершеною роботою, яку відзначає послідовність і цілеспрямованість у вирішенні конкретного питання біології – з'ясування вікових особливостей адаптації ссавців до токсичної дії іонів міді та етанолу та можливості її корекції біологічно активними речовинами. Дисертант проявив високий рівень володіння сучасними експериментальними методами біології, обізнаність із сучасною науковою літературою по темі дослідження. Одержані результати відкривають нові можливості у методичному обґрунтуванні новітньої концепції експосомі.

**9. Загальні висновки щодо дисертаційної роботи.** Дисертація Акжигітова Рустама Анвяровича «Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді» на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія є завершеною науковою працею, що виконана на належному науково-теоретичному рівні з логічно та доступно викладеним матеріалом. У роботі вирішено важливе наукове завдання, яке полягає у встановленні вікових особливостей адаптації щурів до токсичного впливу іонів купруму за участю металодепонувальних протеїнів металотіонеїнів та запропоновано ефективні шляхи корекції токсичності купруму.

Здобувач Акжигітов Рустам Анвярович заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент, доктор  
біологічних наук, професор,  
професор кафедри хімії та  
методики її навчання  
Тернопільського національного  
педагогічного університету імені  
Володимира Гнатюка

Оксана СТОЛЯР

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ  
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 13:06:55 31.07.2024

Назва файлу з підписом: Stoliar\_Review\_Akzhyhitov (1).pdf  
Розмір файлу з підписом: 239.9 КБ

Перевірені файли:  
Назва файлу без підпису: Stoliar\_Review\_Akzhyhitov (1).pdf  
Розмір файлу без підпису: 205.9 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: СТОЛЯР ОКСАНА БОРИСІВНА  
П.І.Б.: СТОЛЯР ОКСАНА БОРИСІВНА  
Країна: Україна  
РНОКПП: 2042902187  
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА  
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 13:06:52 31.07.2024  
Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"  
Серійний номер: 5E984D526F82F38F0400000035C02B01562A2405  
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145  
Тип підпису: Удосконалений  
Тип контейнера: Підписаний PDF-файл (PAdES)  
Формат підпису: З повними даними для перевірки (PAdES-B-LT)  
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2024.04.15 13:00

Голові разової спеціалізованої  
вченої ради Харківського  
національного університету  
імені В. Н. Каразіна доценту  
Володимиру БЕРЕСТУ  
майдан Свободи 4,  
м. Харків, 61022

### **Відгук**

офіційного опонента, професора кафедри біологічної хімії запорізького державного медико-фармацевтичного університету, доктора біологічних наук, професора Швеця Володимира Миколайовича на дисертаційну роботу Акжигітова Рустама Анвяровича «Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»

#### **1. Обґрунтування вибору теми дослідження.**

Мідь являє собою один з найважливіших мікроелементів, що є необхідним для нормального функціонування людського організму, а його нестача може спровокувати ряд патологічних станів, що включають ураження шкіри, м'язів, кровотворної системи тощо. Також загальновідомими є ролі міді у життєдіяльності рослинних організмів, молюсків та членистоногих. Мідь є важливим об'єктом дослідження протеоміки, що пов'язано зі значною кількістю відомих мідь-зв'язуючих білків. В той самий час суттєвий надлишок міді в організмі, є шкідливим та веде до ураження цілого ряду органів і систем. Враховуючи той факт, що мідь є важливим матеріалом для сучасної техніки, а її солі широко використовуються в сільському господарстві та для створення електрохімічних джерел струму токсичне ураження людського організму мідь-вмісними сполуками є вкрай вірогідним. Зазначене актуалізує

дослідження, що присвячені вивченню впливу сполук міді на окремі органи і системи живих організмів та розробці методів корекції зазначеного впливу. Саме зазначеній тематиці, а саме комплексному вивченню впливу мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді і присвячено представлене дослідження.

Все вищезазначене зумовлює та підтверджує актуальність обраної теми дисертаційного дослідження Акжигітова Р.А., визначають її доцільність та вагомість з точки зору як наукового, так і практичного значення.

**2. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому і оформлення.** Дисертація складається з анотацій, вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел та одного додатку. Загальний обсяг роботи складає 148 сторінок друкованого тексту: 118 сторінок основного тексту, 35 рисунків, 5 таблиць, списку використаних джерел із 139 найменувань.

У *вступі* дисертації автор чітко формулює мету та завдання, а також коротко викладає основні положення роботи із зазначенням ступеню новизни і практичного значення отриманих результатів. Завдання достатні для досягнення поставленої мети і свідчать про вміння Акжигітова Рустама Анвяровича принципово правильно планувати наукові дослідження.

У *першому розділі* автором проведено критичний огляд опублікованих відомостей про вплив катіонів міді на роботу печінки в різноманітних станах. Проаналізовано результати раніше опублікованих робіт щодо ролі та впливу дефіциту та надлишку іонів міді, а також можливості їх використання для моделювання патологічних станів печінки.

Якісне викладення матеріалу аналізу друкованих джерел дозволяє легко визначитись з напрямком виконання експериментальної та біологічної частини. У кінці огляду літератури автор дає короткі висновки, які

відображають подальшу мету роботи, обґрунтовують вибір об'єкту і предмету дослідження.

*Другий розділ* представляє собою послідовне викладення матеріалів та методів дослідження. Методики, які були використані, є сучасними і коректними в плані вирішення конкретних завдань і мети дослідження, й отримання необхідної вірогідності результатів. Слід зазначити, що автором було використано ряд сучасних статистичних, інструментальних та фізико-хімічних методів (атомно абсорбційна спектрофотометрія, гель-хроматографія, матрично-активована лазерна десорбційна/іонізаційна часопротітна мас-спектрометрія, вакуумне центрифугування), які дозволили дослідити формування адаптивного потенціалу тварин різного віку, а також можливості підвищення адаптивного потенціалу з використанням біологічно активних сполук. Розроблені сучасні дизайни експериментів (дослідження впливу компонентів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*, впливу вітаміну А на виживання молодих пацюків лінії Wistar).

У *третьому розділі* дисертант описує результати власних досліджень. Значну частину роботи становлять результати експериментальних досліджень, які виконані на тваринних моделях з використанням водної сірчаної кислоти міді у якості моделі мідь-індукованого фіброзу печінки. Автором вивчено особливості внутрішньоклітинного розподілу іонів міді у тварин різного віку при введенні водного міді сульфату, утворення комплексів іонів міді з різними білками фракції низькомолекулярних білків цитозолу, характеристики антиоксидантної системи на фоні зв'язування надлишку іонів міді з металотіонеїнами та вплив етанолу на окремі фізіологічні та біохімічні показники тварин. Результати цих досліджень показали важливі аспекти формування адаптивної відповіді на токсичні впливи навколишнього середовища. Зокрема, виявлено, що молоді та старі тварини реагують по-



різному. Дослідження також виявило різницю у віковій залежності адаптивного потенціалу організму.

Додатково автором вивчена можливість застосування біологічно активних компонентів одержаних з грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*, а також ретинолу ацетату для корекції мідь-індукованого токсичного ураження печінки.

Наприкінці розділу «Результати досліджень та їх обговорення» дисертант конкретно та лаконічно узагальнив всі отримані ним дані.

**Висновки** обґрунтовані експериментальними даними, що у цілому відображають результати роботи, підкреслюють наукову новизну та практичну цінність проведених досліджень.

**Список використаних джерел** свідчить про те, що під час роботи було проаналізовано сучасні результати наукових досліджень.

**У додатку** наведено список публікацій автора.

Дисертація є завершеною науковою працею, її оформлення відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

### **3. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна на базі НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна згідно плану науково-дослідної роботи кафедри.

#### **4. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Характеристика роботи є вкрай позитивною. Дослідження є вдало спланованим та виконано на високому науковому рівні, а використання сучасних методів дослідження не залишають місця сумнівам щодо одержаних результатів, що дозволило вирішити поставлені завдання. Дисертаційна робота ґрунтується на достатньому фактичному матеріалі та правильному формуванні експериментальних груп.

Проведені дослідження відповідають міжнародним біоетичним та правовим нормам, що засвідчено біоетичною комісією Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна (витяг з Протоколу № 2 від 14 травня 2024 р.) та зазначено про відсутність порушень біоетичних норм при проведенні експериментальних досліджень.

Отже, усі результати, наукові положення та висновки, зазначені у дисертаційній роботі, слід вважати обґрунтованими та достовірними.

#### **5. Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна.**

Наведені у дисертаційній роботі результати відображені у 8 статтях, 7 з яких входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science, серед яких, особливо хотілось би відзначити публікацію в виданні Journal of Clinical and Experimental Hepatology (Q2), наявність якої безумовно свідчить про вкрай високий рівень роботи. Наукова новизна отриманих результатів дослідження полягає у наступному:

1. Дисертантом було показано, що темпоральна адаптивна відповідь організму на токсичні впливи залежить від віку тварин, а точніше від початкових функціональних характеристик систем організму, які беруть участь у формуванні відповіді (початковий метаболічний стан).

2. Показано, що зв'язування металотіонеїнів з молекулярною масою приблизно 6200 Да в цитозолі клітин печінки в моделі Cu-індукованого фіброзу печінки має некооперативний характер.
3. Виявлено меншу групову стійкість старих тварин до хронічної дії етанолу порівняно з молодими тваринами.
4. На прикладі Cu-індукованого фіброзу печінки та хронічного випаювання розчином етанолу у якості негативного фактора середовища було показано, що молоді та старі тварини мають принципово різний адаптивний потенціал у відповідь на дію негативного фактора.
5. Встановлено, що адаптивний потенціал організму має вік-залежний характер та як мінімум два різних способи своєї реалізації. Показано, що його можна стимулювати біологічно активними сполуками, у тому числі компонентами грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*.

Результати дисертаційного дослідження були представлені науковій спільноті на наукових зібраннях з питань біології на міжнародному рівні. Всі зазначені матеріали у повному обсязі відображають результати досліджень та висновки представлені в роботі. Більшість наукових публікацій надруковано із співавторами, але чітко визначені особистий внесок та участь дисертанта.

## **6. Практичне значення одержаних результатів.**

Результати отриманих досліджень мають важливе теоретичне і практичне значення в контексті розуміння віково-залежних механізмів адаптації та розвитку хронічних патологій. Вивчення впливу біологічно активних компонентів з грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae* на організм молодих і старих тварин, проведене в НДІ Біології ХНУ ім. В.Н. Каразіна, розширює можливості їхнього застосування, зокрема в геріатрії.

Особлива увага приділяється вивченню ролі ретинолу ацетату для корекції мідь-індукованого токсичного ураження печінки, що має

безпосереднє практичне значення для розробки нових методів лікування цирозу печінки. Ці дослідження не лише розкривають основні механізми дії вітаміну А, а й вказують на можливі шляхи його подальшого застосування у клінічній практиці.

Отримані результати також інтегруються у навчальний процес, сприяючи покращенню якості навчання на курсах, таких як "Загальна біотехнологія", "Молекулярна біологія", "Основи біоінженерії" на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Результати досліджень стають важливими джерелами знань для студентів і молодих дослідників, що сприяє розвитку науки в цих областях та стимулює подальший прогрес у біологічних науках.

**7. Дотримання академічної доброчесності.** За результатами аналізу дисертаційної роботи та публікацій автора порушення академічної доброчесності не виявлено. Елементи фальсифікації чи фабрикації тексту в роботі відсутні. Текст наданих матеріалів дисертації є оригінальним.

#### **8. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.**

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, виконана на високому науковому рівні та викладена з використанням сучасної української термінології. У процесі рецензування зауваження щодо змісту роботи та її оформлення не виникли. Проте у плані наукової дискусії хотілося б почути відповіді на нижче наведені запитання.

1. Який передбачуваний вами механізм індукції металотеонеїнів катіонами міді? Чи є літературні дані щодо цієї теми?

2. На якій підставі ви неодноразово в тексті зазначаєте, що кооперативність передбачає підвищення специфічності зв'язування міді, а не спорідненості до неї?

3. Ви неодноразово вказуєте, що металотіонеїни білки з порівняно невеликою молекулярною масою, крім того, вони не є олігомерними молекулами. Але це не характерно для білків з кооперативним ефектом.

4. Чому при дослідженні антиоксидантних ферментів ви обрали пару ГПО та глутатіонредуктазу? Чому не були обрані ферменти, які каталізують інші не менш важливі антиоксидантні реакції (СОД, фєрооксидаза та ін)?

5. Чому при розгляді адаптації до токсичної дії етанолу на перше місце ви ставите результати досліджень алкогольдегідрогенази? При хронічній інтоксикації етанолом змінюються шляхи його метаболізму в печінці і основне значення набуває його окислення в мікросомальній етанолокислювальній системі та в етанолоксидазних реакціях?

У цілому наведені дискусійні питання не мають принципового характеру та жодним чином не зменшують наукової і практичної цінності отриманих автором результатів.

## **9. Загальні висновки щодо дисертаційної роботи.**

Розглянувши дисертаційну роботу Акжигітова Рустама Анвяровича на тему «Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді» та наукові публікації за темою дослідження, вважаю, є самостійною завершеною науковою працею, характеризується науковою новизною, актуальністю та практичною значущістю, відповідає поставленій меті та завданням. Дисертаційна робота Акжигітова Рустама Анвяровича повністю відповідає чинним вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії»,

затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 і вимогам оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40, а здобувач Акжигітов Рустам Анвярович заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент, доктор  
біологічних наук, професор,  
професор кафедри біологічної  
хімії запорізького державного  
медико-фармацевтичного  
університету

Володимир ШВЕЦЬ

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ  
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 12:39:52 29.07.2024

Назва файлу з підписом: Відгук\_Щвець В.М. на роботу Рустама Акжигітова.pdf  
Розмір файлу з підписом: 370.3 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Відгук\_Щвець В.М. на роботу Рустама Акжигітова.pdf  
Розмір файлу без підпису: 336.3 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: ШВЕЦЬ ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ

П.І.Б.: ШВЕЦЬ ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ

Країна: Україна

РНОКПП: 2366111318

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 12:39:51  
29.07.2024

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F040000008B0C6F01AE813605

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Удосконалений

Тип контейнера: Підписаний PDF-файл (PAdES)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (PAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2024.04.15 13:00

Голові разової спеціалізованої  
вченої ради Харківського  
національного університету  
імені В. Н. Каразіна доценту  
Володимиру БЕРЕСТУ  
майдан Свободи 4,  
м. Харків, 61022

### **Рецензія**

офіційного рецензента, доцента кафедри біохімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, кандидата біологічних наук, доцента Кот Катерини Василівни на дисертаційну роботу Акжигітова Рустама Анвяровича «Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»

#### **1. Обґрунтування вибору теми дослідження**

Актуальність теми дисертації не викликає сумнівів, оскільки одним з актуальних напрямків в біології є дослідження формування реакцій відповіді організму на дію біологічно активних компонентів різної природи, які можуть підвищувати адаптивний потенціал організму або зменшувати наслідки негативних впливів, якщо організм вже зіткнувся з ними.

Метою дисертаційної роботи було дослідити формування адаптивного потенціалу тварин різного віку на прикладі дій 5-водної сірчаної кислоти міді та етанолу, роль у цих процесах мідьзв'язуючих білків, а також можливості підвищення адаптивного потенціалу з використанням біологічно активних сполук.

#### **2. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому і оформлення**

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів досліджень та їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури. Дисертацію викладено на 148 сторінках, вона містить 35 рисунків та 5 таблиць, 139 пунктів цитованої літератури.

Дисертація написана грамотною українською мовою з дотриманням норм наукового стилю. Проте, написання деяких термінів потребує перевірки та корекції (зауваження 1).

Рукопис складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділів, в яких надані відомості про матеріали і



методи дослідження, а також представлені та обговорені отримані результати, висновки, та список наукових праць.

У вступі чітко відображено обґрунтування вибору теми дослідження дисертантом, мету та завдання дослідження, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок дисертанта та публікації за матеріалами дисертаційної роботи.

У першому розділі розкривається сучасний стан проблем, вирішення яких стало основним завданням дисертанта. Розділ висвітлює відомі на тепер дані про іони міді як агент токсичного фактора середовища для дослідження механізмів формування адаптивного потенціалу печінки; хронічну патологію печінки як наслідок адаптивної відповіді; обмін іонів міді на тлі зниження адаптивного потенціалу та характеристику металотіонеїнів в обміні іонів міді. Особливо дисертант робить акцент на єдність кількох фундаментальних принципів структурно-функціональної організації організму та обґрунтування алкогольної моделі як негативного фактора середовища.

Огляд літератури базується як на публікаціях за останні три роки (2021 – 2024), так і на наукових працях, що є першоджерелами у формуванні уявлень про можливі ролі металотіонеїнів у процесах формування адаптації у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки. Це дозволило дисертанту чітко простежити сучасні розробки, їхні недоліки, а також існуючі тенденції та перспективи за обраною темою дисертаційного дослідження, обґрунтувати актуальність теми дослідження та показати доцільність виконання дисертаційної роботи в обраному напрямку.

Другий розділ присвячений плануванню експериментальної частини роботи та методичним підходам, які дисертант використовував при проведенні дослідження. Структура та стиль викладення розділу «Матеріали та методи» зручні для сприйняття і не викликають зауважень. В розділі охарактеризовано дизайн проведеного експериментального дослідження, включаючи опис моделі та етапів. Описано алгоритм статистичного аналізу виявлених відмінностей між групами. Наявний в розділі ілюстративний матеріал надає змогу додатково оцінити описані методичні підходи. Усі маніпуляції з тваринами проводились з урахуванням вимог чинного законодавства України та міжнародного законодавства з біоетики та узгоджувалися комісією з біоетики на засіданні НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Достовірність результатів дисертації досягнута за рахунок використання сучасних методів – гель-хроматографії, мас-спектрометрії, спектрофотометрії.

Застосовані в роботі методичні прийоми та сучасне обладнання адекватні до поставлених завдань та дали змогу виконати дисертацію на

високому науково-методичному рівні. Дані проаналізовані із застосуванням адекватних методів статистичної обробки.

Маю питання щодо методичних підходів при підготовці та проведенні гель-хроматографії (питання 2.1 – 2.2).

У третьому розділі дисертант описує результати власних досліджень. Результати графічної та математичної обробки експериментальних даних представлено у вигляді рисунків та таблиць. Використана інфографіка доповнює та вичерпно пояснює значення отриманих даних. Опис та обговорення результатів у кожному підрозділі завершується висновками та переліком публікацій за матеріалом, обговореним у цьому підрозділі. Наприкінці розділу «Результати досліджень та їх обговорення» дисертант узагальнив всі отримані ним дані.

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

Дисертаційна робота виконана на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, на базі НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна згідно плану науково-дослідної роботи кафедри.

### **4. Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації**

Зроблені автором дисертації висновки логічно та обґрунтовано походять з наведених результатів, а сама виконана дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною роботою.

### **5. Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна**

Дисертант отримав наступні основні наукові результати:

1. В цитоплазмі клітин печінки старих пацюків (20 місяців) в початковому стані (до впливу експериментального негативного фактора середовища) міститься більше металотіонеїнів (МТ) з молекулярною масою приблизно 6200 Да у порівнянні з молодими пацюками (3 місяці). Введення тваринам 1 циклу 5-водної сірчанокислої міді призводить до збільшення кількості МТ. Зв'язування іонів міді з МТ відбувається некооперативно, а інші білки можуть конкурувати з МТ за зв'язування з іонами міді.

2. Наряду зі фракцією низькомолекулярних білків цитозоля, іони міді також зв'язувались з компонентами мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума та іншими компонентами цитозоля кліток печінки. При цьому характер внутрішньоклітинного розподілу іонів міді залежав від віку.

3. Введення 5-водної сірчаноокислої міді (два цикли з інтервалом між ними 30 днів) спричиняло розвиток фіброзу печінки. Цей процес супроводжувався збільшенням ступеня зв'язування іонів міді з МТ («специфічністю зв'язування»), вираженим як у старих тварин (більше в 5 разів порівняно з першим циклом), так і у молодих (більше в 3 разів порівняно з першим циклом). Однак більш виражене інгібування антиоксидантної системи та інших систем організму у старих тварин на тлі в онтогенезі призводило до летальності у подальшому.

4. Хронічний вплив 6–15% етанолу підтвердив наявність вік-залежних механізмів адаптивного потенціалу, який був менш вираженими у старих тварин порівняно з молодими. Молоді та старі тварини відрізняються за початковими показниками, які беруть участь у метаболізмі етанолу, що впливає на вибір подальших стратегій адаптації.

5. Попередні введення низькомолекулярних компонентів грибів (*Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*) 6 днів у дозі 0,05 мл/100 г маси тіла здатні модифікувати адаптивну відповідь тварин різного віку на гостро-продовжану дію токсичного фактору середовища, що підтверджує вплив початкових функціональних характеристик систем організму на адаптивний потенціал тварин різного віку на токсичну дію іонів міді.

6. Попередні введення Вітаміну А 3 дні у трикратній, десятикратній та тридцятикратній від добової норми дози не здатний модифікувати адаптивну відповідь на подальшу токсичну дію іонів міді.

Новизна отриманих результатів полягає у тому, що вперше було показано, що збільшення кількості металотіонеїнів у цитозолі клітин печінки на фоні дії іонів міді змінює подальший характер зв'язування іонів міді з металотіонеїнами і призводить до вік-залежного внутріклітинного розподілу іонів міді. Експериментально обґрунтована гіпотеза, згідно з якою адаптивний потенціал впливає на «вибір» стратегії адаптивної відповіді. Доведено, що адаптивний потенціал організму має вік-залежний характер та як мінімум два різних способи своєї реалізації. Показано, що його можна стимулювати біологічно активними сполуками, у тому числі компонентами грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*.

## **6. Апробація дисертації та публікації**

Основні наукові результати та висновки дисертації відображено в публікаціях у фахових та міжнародних наукових виданнях.

У відповідності з інформацією Додатку 1 «Список публікацій здобувача», наведеною на сторінці 147-148 дисертаційної роботи, за

матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 8 статей: 1 стаття відноситься до публікації у наукових фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science; 6 статей відносяться до публікацій у періодичному науковому виданні, які входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу та 1 стаття у V міжнародній науково-практичній конференції «Ricerche Scientifiche e Metodi della Loro Realizzazione: Esperienza Mondiale e Realtà Domestiche» (Італія). Крім того, наведено 2 наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації на міжнародних конференціях.

Кількість публікацій, що висвітлюють результати дисертації, відповідає вимогам п.8.4 постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року.

## **7. Практичне значення отриманих результатів**

Отримані результати мають фундаментальне значення для розуміння вік-залежних механізмів адаптації та формування хронічних патологій. Розуміння можливих механізмів дії біологічно активних компонентів із грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae* на організм молодих і старих тварин, одержаних в НДІ Біології ХНУ імені В. Н. Каразіна, розширює можливості їх застосування, зокрема в геріатрії. Вивчення ролі вітаміну А в механізмах адаптивної відповіді у тварин має практичне значення для дослідження механізмів та розробки лікування цирозу печінки. Результати дослідження використовуються при викладанні курсів, таких як «Загальна біотехнологія», «Молекулярна біологія», «Основи біоінженерії» на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, а також під час виконання кваліфікаційних робіт бакалавра.

## **8. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації**

Дискусійні положення:

1. Згідно інструкції фірми-виробника до розчину ретинол ацетату, який вводився лабораторним тваринам, крім основної діючої речовини (ретинол ацетату), розчин містить допоміжну речовину – олію соєву, яка містить олеїновою кислоту, лінолеву кислоту та інші. Чи обговорювався їх можливий вплив на метаболізм печінки в цілому? Чи можуть ці компоненти сформувати виявлену нездатність вітаміну А модифікувати адаптивну відповідь на подальшу токсичну дію іонів міді?
2. Питання щодо проведення гель-хроматографії.

2.1 Відомо, що набухання в процесі зберігання не звільняє частинки Sephadex від повітря у порах. Крім того, в процесі зберігання мікрочастки пористого Sephadex сорбують розчинений кисень з рідини. Наявність повітря в порах унеможливорює потрапляння молекул в пори та їх міграцію крізь них з током рідини в колонці, а отже нівелює функціональність гелю та унеможливорює хроматографію взагалі. Зазвичай, пори Sephadex звільняють від повітря вакуумною обробкою.

Чи проводилась вакуумна обробка гелю Sephadex G-75 перед набиттям колонки?

Також відомо, що в процесі зберігання, набухання та механічного впливу при перемішуванні частина мікросфер Sephadex обов'язково втрачає свою структурну цілісність та фрагментуються. Потрапляючи до колонки, ці пошкоджені частинки утворюють зони, в яких розділення не відбувається. Зазвичай, перед наповненням колонки наявність таких пошкоджених мікросфер контролюють світловою мікроскопією та відмивають їх.

Чи контролювали ступінь ушкодження частинок Sephadex та чи відмивали гель від них перед наповненням колонки?

2.2 Діапазон молекулярних мас родини білків металотіонеїнів складає 500-14000 Да. Діапазон роздільної здатності Sephadex G-75 3000-80000 Да. Таким чином втрачається можливість проаналізувати металотіонеїни з молекулярною масою від 500 до 3000 Да, що добре видно при подальшому аналізі мас-спектрофотометрією.

Чому дисертант для гель-хроматографії вибрав у якості носія Sephadex G-75? Враховуючи те, що молекул більше за 20000 Да не було ідентифіковано, чи не правильніше було б використати марку G-50 з діапазоном роздільної здатності 1500 -30000 Да для додаткової можливості аналізу білків з меншою молекулярною масою?

Зауваження:

1. Є зауваження щодо написання наукової термінології, наприклад – «імунокомпетентних» замість «імунокомпетентних» (стор. 9, 40 і далі в тексті), «Per Os» замість «per os» (стор. 40, 55 і далі в тексті) і т. ін.
2. Зазначаючи точність вимірювання маси тварин на сторінці 36 дисертаційної роботи, автор зазначає «...з точністю один знак після нуля». Вважаю цей вислів невдалим, оскільки він не надає конкретної інформації щодо дискретності (кроку точності) вимірювання, та, головне, одиниць вимірювання. Слід було б написати «...з точністю до одної десятої», або зазначити в тексті крок точності (0,1 або ін.) та одиницю вимірювання (мг або ін.) кроку точності.

## **9. Загальні висновки щодо дисертаційної роботи**

Зауваження до дисертаційної роботи не зменшують її теоретичного та практичного значення.

Дисертаційна робота Акжигітова Рустама Анвяровича «Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді» є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій» (з наступними змінами) та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р., а її автор Акжигітов Рустам Анвярович заслуговує присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний рецензент,  
кандидат біологічних наук, доцент,  
доцент кафедри біохімії  
Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна

Катерина КОТ

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ  
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 00:23:16 30.07.2024

Назва файлу з підписом: Рецензія\_Кот КВ\_Акжигітов\_КЕП.pdf  
Розмір файлу з підписом: 185.9 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Рецензія\_Кот КВ\_Акжигітов\_КЕП.pdf  
Розмір файлу без підпису: 152.0 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: КОТ КАТЕРИНА ВАСИЛІВНА

П.І.Б.: КОТ КАТЕРИНА ВАСИЛІВНА

Країна: Україна

РНОКПП: 3166806529

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 00:23:17  
30.07.2024

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F04000000DE296F0164D03605

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Удосконалений

Тип контейнера: Підписаний PDF-файл (PAdES)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (PAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2024.04.15 13:00

Голові разової спеціалізованої  
вченої ради  
Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна  
доценту, д. фіз.-мат. н.,  
Володимиру БЕРЕСТУ  
майдан Свободи 4, м. Харків, 61022

## РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента доктора медичних наук (спеціальність – професора кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна ЛЯДОВОЇ Тетяни Іванівни на дисертаційну роботу здобувача Акжигітова Рустама Анвяровича на тему «Вплив мідьзв’язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді» подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія зі спеціальності 091 – Біологія

### **1. Обґрунтування вибору теми дослідження.**

Актуальність теми дослідження, обрана дисертантом не викликає сумнівів, оскільки функціональну роль печінки в організмі важко переоцінити. Безумовно, більшість метаболічних процесів таких як підтримка гомеостазу, детоксикація, екскреція жовчних кислот, гормональна, кровотворна та участь у процесах травлення відіграють дуже важливу роль у фізіологічних та патологічних процесах організму.

Предметом дослідження багатьох науковців є порушення метаболізму печінки, яка призводить до формування різноманітних патологічних станів. Як основний детоксикаційний орган печінка постійно піддається впливу токсичних ксенобіотиків, що може призводити до патологічних змін, асоційованих із розвитком різноманітних патологій – гепатиту, стеатозу, фіброзу, цирозу та онкологічних захворювань.

Тому експериментальні дослідження, що присвячені вивченню вік-залежних відмінностей адаптивного потенціалу на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки та хронічного випаювання пацюків лінії *Wistar* розчином етанолу та способів його підвищення дією біологічно активних сполук різної природи (компоненти грибів *Pleurotus ostreatus* та *Sacharamirses cerevisiae*;



вітамін А в формі ретинол ацетату) є вельми актуальними, оскільки дають можливість дослідити можливості адаптивної відповіді організму.

Підхід автора до вирішення цієї складної проблеми має кілька особливостей, які дуже важливі в її розв'язанні.

По-перше, дослідження адаптації проводиться на двох дуже актуальних факторах навколишнього середовища: іони міді, які є одним з найпоширеніших забруднювачів навколишнього середовища серед важких металів та етилового спирту, який також викликає глибокі метаболічні перебудови в печінці, де здійснюється його метаболізм.

Не можна не відзначити й обґрунтованість проведення досліджень на моделі, що використовується для вікових аспектів щурів, що були задіяні у експериментальному дослідженні (молоді і старі щури), тобто оцінку впливу віку на механізми адаптації та розвиток можливих патологічних станів.

Обґрунтованим є й вибір методології дослідження, яка базується на комплексному дослідженні механізмів адаптації, зокрема достатньо велика увага приділяється фізіологічним та біохімічним методам дослідження, що вкрай важливо для їх розуміння.

## **2. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому і оформлення.**

Дисертація складається з анотації, вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел та одного додатку. Загальний обсяг роботи складає 148 сторінок друкованого тексту: 118 сторінок основного тексту, 35 рисунків, 5 таблиць, списку використаних джерел із 139 найменувань.

У **вступі** обґрунтовано вибір теми дослідження, визначено мету і основні задачі, об'єкт і предмет дисертаційного дослідження, визначено наукову новизну роботи і практичне значення отриманих результатів, і особистий внесок здобувача.

У **першому розділі** проаналізовано сучасні наукові літературні дані присвячені вивченню з теми дисертаційного дослідження. Проведено аналіз ролі та впливу дефіциту та надлишку іонів міді як есенційного мікроелементу в організмі та їх зручності у якості моделювання патологій печінки (Cu-індукований фіброз). Показано, що в метаболізмі іонів міді приймають участь мідьзв'язуючі білки, акцент зроблено на металотіонеїнах печінки як одного з можливих механізмів у формуванні адаптивної відповіді до цих іонів (гостра або гостро-продовжена дія іонів міді). У якості хронічної дії токсикогенного фактору середовища було запропоновано використати модель випаювання етанолом та обґрунтовано зручність цієї моделі порівняно з

Cu-індукованою моделлю фіброзу печінки у дослідженні хронічної дії негативного фактору середовища через їх меншу токсичну дію.

**Другий розділ** детально представлений методиками, що були задіяними у організації експериментального дослідження, матеріалами та методами, підходами та обґрунтуванням використаних моделей токсичного фактору середовища (Cu-індукована модель фіброзу та хронічне випаювання розчином етанолу).

У **третьому розділі** проведений аналіз отриманих результатів та їх обговорення. За результатами дослідження представлено, що розподіл іонів міді в компартментах клітин печінки показав, що іони міді зв'язуються не лише з фракцією низькомолекулярних білків (НБ) цитозоля, але й також з ендоплазматичним ретикулумом та мітохондріями.

Мас-спектральний аналіз фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) виявив, що металотіонеїни (МТ) з молекулярною масою близько 6200 Да у молодих та старих тварин демонструють відсутність жорсткої специфічності до зв'язування іонів міді, що вказує на некооперативну модель зв'язування. Аналіз антиоксидантної системи молодих та старих тварин на фоні отриманих результатів з дослідження металотіонеїнів показав, що вони відіграють ключову роль у знешкодженні надлишку іонів міді у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки.

Отримані дані з хронічної дії 6–15% етанолу підтвердили наявність різних вік-залежних механізмів адаптивної відповіді, які характеризуються використанням старими специфічних молекулярних механізмів до дії токсичних факторів середовища.

**Висновки** дисертаційної роботи підкреслюють наукову новизну проведених досліджень та логічно виходять із викладеного матеріалу, достатньо повно його відображають, дають відповідь на поставлені в роботі мету та завдання дослідження.

**Список використаних джерел** свідчить про те, що під час роботи було проаналізовано сучасні результати наукових досліджень.

Дисертація є завершеною науковою працею, а її оформлення відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44), та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

### **3. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна на базі НДІ Біології ХНУ імені В.Н. Каразіна.

### **4. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій забезпечено коректним використанням методів роботи з тваринами, біохімічними та фізіологічними методами дослідження.

Достовірність і обґрунтованість отриманих результатів забезпечується: аналізом наукової літератури з теми дослідження;

використаними: дизайном експерименту, методами та статистичним аналізом отриманих результатів;

публікацією статей у якості співавтора, результати яких увійшли у дисертаційну роботу.

### **5. Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна.**

Основні наукові результати та висновки дисертації пройшли апробацію під час міжнародних наукових конференцій та знайшли відображення в публікаціях у фахових та міжнародних наукових виданнях. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 8 наукових праць, серед яких: 7 публікації у міжнародних виданнях, які входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science; 1 публікація на міжнародній конференції.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у наступному:

1. в цитоплазмі клітин печінки старих пацюків (20 місяців) в початковому стані (до впливу експериментального негативного фактора середовища) міститься більше металотіонеїнів (МТ) з молекулярною масою приблизно 6200 Да у порівнянні з молодими пацюками (3 місяці).

2. наряду з фракцією низькомолекулярних білків цитозоля, іони міді також зв'язувались з компонентами мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума та іншими компонентами цитозоля кліток печінки. При цьому характер внутрішньоклітинного розподілу іонів міді залежав від віку.

3. введення 5 водної сірчаноокислої міді (два цикли з інтервалом між ними 30 днів) спричиняло розвиток фіброзу печінки.

4. хронічний вплив 6–15% етанолу підтвердив наявність вік-залежних механізмів адаптивного потенціалу, який був менш вираженими у старих тварин порівняно з молодими.

5. попередні введення низькомолекулярних компонентів грибів (*Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*) протягом 6 днів у дозі 0,05 мл/100 г маси тіла здатні модифікувати адаптивну відповідь тварин різного віку на гостро пролонговану дію токсичного фактору середовища.

6. попередні введення Вітаміну А 3 дні у трикратній, десятикратній та тридцятикратній від добової норми дози не здатні модифікувати адаптивну відповідь на подальшу токсичну дію іонів міді.

## **6. Практичне значення отриманих результатів.**

Було показано, що результати важливі для розуміння вікових адаптацій і хронічних захворювань. Дослідження компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae* на молодих і старих тваринах може підвищувати адаптивний потенціал тварин. Отримані результати використовуються в курсах і дипломних роботах на кафедрі молекулярної біології та біотехнології ХНУ імені В.Н. Каразіна.

## **7. Дотримання академічної доброчесності.**

За результатами аналізу дисертаційної роботи та публікацій автора порушення академічної доброчесності не виявлено. Елементи фальсифікації чи фабрикації тексту в роботі відсутні, що було у тому числі показано з використанням антиплагіатного аналізу [Strikeplagiarism.com](http://Strikeplagiarism.com).

## **8. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.**

Загалом дисертація оформлена відповідно наказу №40 МОН України від 12.01.2017 року. Мета наукової роботи досягнута. Завдання виконані у повному обсязі. Принципових і суттєвих зауважень до роботи не виникло, всі розділи були оцінені позитивно. Є окремі зауваження стосовно оформлення результатів та висновків дослідження, були виявлені стилістичні помилки. Однак зазначені зауваження не є принциповими та не знижують загальний високий рівень виконаної роботи.

Крім того, є деякі питання, які хотілось би поставити у межах наукової дискусії:

1. На Вашу думку з чим пов'язано підвищення в цитоплазмі гепатоцитів старих тварин рівнів металотіонеїнів та вікзалежний внутрішньоклітинний розподіл іонів міді?
2. Якою шкалою Ви користувалися для оцінки рівня фіброзу печінки?
3. Чому рівень алкогольдегідрогенази мав відмінності у різних вікових групах?

4. На Вашу думку чому не було досягнуто терапевтичної ефективності різних доз вітаміну А при проведенні цього експериментального дослідження?

Вказані недоліки не зменшують якість результатів дисертаційної роботи і обґрунтованість неведених здобувачем висновків.

#### **9. Загальні висновки щодо дисертаційної роботи.**

Дисертаційна робота Акжигітова Рустама Анвяровича «Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді» на здобуття наукового ступеня доктора філософії є завершеною науковою працею, що виконана на належному науково-теоретичному рівні, яка відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій» (з наступними змінами) та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12.01.2022 р., а її автор Акжигітов Рустам Анвярович заслуговує присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

#### **Офіційний рецензент,**

декан медичного факультету,  
професор кафедри інфекційних хвороб  
та клінічної імунології медичного факультету  
Харківського національного університету  
імені В. Н. Каразіна  
д.мед.н., професор

Тетяна ЛЯДОВА

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 11:42:44 02.08.2024

Назва файлу з підписом: Ренцензія.pdf.p7s

Розмір файлу з підписом: 443.1 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Ренцензія.pdf

Розмір файлу без підпису: 425.0 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Лядова Тетяна Іванівна

П.І.Б.: Лядова Тетяна Іванівна

Країна: Україна

РНОКПП: 2803217567

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 11:42:39 02.08.2024

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF970400000052D315000AEDC301

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в одному файлі (CAAdES enveloped)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2024.04.15 13:00