

ВІДГУК

офіційного опонента

завідувача відділу біології відтворення риб

Інституту гідробіології НАН України

доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника,

ПОТРОХОВА Олександра Спиридоновича

на дисертацію **МАРКІВА Віктора Степановича** на тему: «**Особливості ліпідного**

складу та стану антиоксидантної системи прісноводних риб за дії іонів кобальту»,

поданої на здобуття ступеня доктора філософії

зі спеціальності 091 «Біологія»

галузі знань 09 «Біологія»

Актуальність обраної теми досліджень. Забруднення важкими металами прісноводних гідроекосистем є однією із найактуальніших проблем сучасної екотоксикології. Важкі метали широко використовуються у промисловості та сільському господарстві та становлять істотну загрозу для водної біоти. Крім того вони схильні до біоаккумуляції, що призводить до ослаблення організму, проблем з ростом і розвитком.

Одним з таких металів є кобальт, підвищена концентрація якого за антропогенним навантаженням може значно зростати та здійснювати токсичний вплив на водні організми. Тому надзвичайно актуальним є питання моніторингу кобальту у гідроекосистемах. При цьому кобальту притаманні важливі біохімічні функції в організмі як компонента кобаламіну та необхідного кофактора для багатьох ферментативних систем, але його вміст обмежується лише слідовими рівнями. Збільшення рівня цього металу у водному середовищі та його накопичення у тканинах гідробіонтів, зокрема риб, зумовлюють виражений токсикологічний ефект.

Риб часто використовують як біоіндикатори для оцінки стану прісноводних екосистем, оскільки вони живуть у водному середовищі, яке є місцем накопичення хімічних і біологічних забруднювачів та дуже чутливі до будь-яких змін у ньому.

Окремі фракції ліпідного складу та стан антиоксидантної системи риб можуть свідчити про наявність підвищених концентрацій іонів кобальту у воді та їх можна використовувати як біомаркери.

Тому вважаю, що обрана тема дисертації та хід її виконання є актуальним для сучасних наукових досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах держтематики «Дослідження токсикорезистентності прісноводних риб до дії чинників водного середовища» (державний реєстраційний номер 0122U001543), міжнародного проекту NATO SPS Multiyear Research Project G6094 та проекту МОН України

для молодих вчених «Оцінка впливу мілітарного забруднення на безпечність річково-басейнових систем на основі біореакцій та математичного моделювання».

Оформлення дисертації та дотримання академічної доброчесності. Дисертація Марківа В.С. відповідає чинним вимогам і нормативам Міністерства освіти і науки України. Вона виконана у Тернопільському національному педагогічному університеті імені В. Гнатюка. Зміст дисертації побудований на основі авторської наукової ідеї та представлений у структурі, що включає всі ключові елементи наукового дослідження: анотації українською та англійською мовами, вступ, розділи з оглядом літератури, матеріалами і методами, результатами досліджень, їх аналізом, узагальненням, висновками, списком використаних джерел. Робота і наукові публікації Марківа В. підтверджують високий рівень академічної доброчесності та відповідне оформлення посилань.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації. Обґрунтованість та достовірність наукових результатів забезпечена проведеними дослідженнями з коректним підбором загальнонаукових та спеціальних методів дослідження, застосуванням сучасної методичної та аналітичної бази, що дають можливість достовірно оцінити величину вимірюваних параметрів. Основні наукові положення, викладені в дисертації, апробовано на науково-практичних конференціях різних рівнів, публікаціями у наукових фахових виданнях.

Наукове та практичне значення отриманих результатів дослідження. Дисертантом вперше встановлено закономірності перебудови ліпідного складу, інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів та функціонування антиоксидантної системи у карася та щуки за дії іонів кобальту. Встановлено міжвидові особливості адаптивної відповіді риб на діючий чинник. Робота розширює уявлення про видову чутливість риб до важких металів.

Автором комплексно охарактеризовано систему «ліпіди – пероксидне окиснення ліпідів – антиоксидантний захист», що дозволяє описати механізм токсичності Co^{2+} як єдиний процес: кобальт \rightarrow активні форми кисню \rightarrow пероксидне окиснення ліпідів \rightarrow перебудова ліпідів \rightarrow активація антиоксидантної системи захисту. Встановлено видоспецифічність стратегій структурного ремоделювання жирнокислотного профілю тканин риб у відповідь на токсичний вплив кобальту.

З'ясовано, що головними мішенями пероксидного окиснення ліпідів виступають есенціальні високоненасичені жирні кислоти: докозагексаєнова (22:6) у карася та ейкозапентаєнова (20:5) у щуки, що призводить до їх виснаження.

Вперше розкрито патологічні механізми порушення архітекtonіки клітинних мембран та мобілізації ліпідних резервів. На основі кореляційного аналізу доведено, що в умовах стресу пул неестерифікованих жирних кислот поповнюється переважно за рахунок деструктивного фосфоліпазного гідролізу структурних мембранних фосфоліпідів (із масивним накопиченням лізофосфатидилхоліну), а не шляхом класичного ліполізу резервних триацилгліцеролів.

Розширено уявлення про функціонування антиоксидантної та детоксикаційної систем риб за умов хронічного токсичного навантаження. Встановлено наявність антагонізму між пулом загального глутатіону та легкоокиснюваних ПНЖК. Виявлено дивергентну реакцію ферменту глутатіон-S-трансферази: здатність до компенсаторної активації у тканинах карася та виражене токсичне інгібування кобальтом у щуки.

Практичне значення роботи полягає у можливості використання отриманих даних для екологічного моніторингу, рибного господарства, а також у розвитку науково-освітнього напрямку. Параметри ліпідного профілю, рівень продуктів ПОЛ, стан ферментативної та неферментативної систем антиоксидантного захисту можуть слугувати чутливими біомаркерами оксидативного стресу у риб та використовуватися у системах біомоніторингу якості водного середовища. Результати дослідження доцільно використовувати у практиці рибного господарства для оцінки фізіологічного стану риб та моделювання наслідків антропогенної трансформації середовища на їх метаболічні процеси і продуктивність. Виявлені зміни жирнокислотного складу можуть бути враховані при оцінці харчової та біологічної цінності рибної продукції за умов дії кобальту.

Отримані дані можуть використовуватися при розробці науково обґрунтованих підходів до нормування вмісту кобальту у водних об'єктах та вдосконаленні систем екологічного контролю. Крім того, встановлені механізми взаємозв'язку між процесами пероксидного окиснення ліпідів, перебудовою жирнокислотного складу та активністю антиоксидантної системи можуть бути корисні у подальших експериментальних дослідженнях для оцінки дії інших токсикантів та пошуку ефективних шляхів корекції оксидативного стресу.

Результати роботи також можуть бути впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Біохімія», «Гідробіологія», «Водна токсикологія», «Експериментальна екологія», «Екологічний моніторинг» для здобувачів закладів вищої освіти природничих спеціальностей.

Ступінь достовірності представленого у дисертації матеріалу підтверджується широким спектром проведених досліджень, підкріплених теоретичним обґрунтуванням та

критичним аналізом наукових літературних джерел за обраною темою. Висновки зроблені автором є логічними та послідовними, впливають із результатів досліджень і повністю відтворюють зміст дисертації. Їх достовірність підтверджується наведеним у дисертації табличним та графічним матеріалом, а також методами математичного аналізу.

Застосування сучасних методів проведення досліджень, опрацювання значного обсягу літературних джерел, використання наукової інформації, що стосуються досліджуваної проблеми, достатня апробація результатів дослідження дають підстави стверджувати, що наукові положення та висновки, сформульовані в дисертації, є достатньо обґрунтованими і достовірними.

Характеристика основних положень роботи. Дисертація Марківа В. є самостійним, цілісним і комплексним науковим дослідженням, що вирішує важливе наукове та практичне завдання в галузі біологічних наук.

Дослідження проведено на високому рівні. Представлений автором у дисертації матеріал викладено грамотно, логічно, з використанням наукової термінології, що свідчить про високий рівень фахової підготовки дисертанта. Дисертація складається з анотації, вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел. Роботу викладено на 134 сторінках, проілюстровано 4 таблицями та 58 рисунками. Список використаних джерел включає 218 джерел, з них 213 – англійською мовою.

Дисертація оформлена відповідно до чинних вимог і нормативів. Зміст роботи розкриває покладену в її основу авторську наукову ідею. У роботі чітко обґрунтовано мету, що полягала у здійсненні порівняльної характеристики змін окремих фракцій ліпідного складу та стану антиоксидантної системи карася та шуки за впливу підвищених концентрацій іонів кобальту у воді. Для досягнення поставленої мети здобувачем визначено конкретні завдання, що були вирішені на основі логічно побудованої програми наукових досліджень та використання сучасних підходів та методів досліджень.

В огляді вітчизняної та зарубіжної фахової літератури (розділ 1) дисертантом критично висвітлює наявну у фаховій літературі інформацію, що торкається теми дисертаційної роботи та акцентує увагу на нез'ясованих питаннях. В цьому розділі систематизовані літературні дані щодо ролі кобальту у фізіологічних процесах в організмі тварин, його токсичного впливу, методів аналізу та контролю кобальту в гідроекосистемах, вплив важких металів на ліпідний обмін

Розділ 2 «Матеріали та методи» включає детальну характеристику об'єктів та методів досліджень. Необхідно відмітити чітко та добре продуманий план проведення досліджень та вдалий підбір об'єктів і методик. Автором застосовано перевірені класичні

методи досліджень. Досить важливо, що автором запропоновано різноплановий набір проведених досліджень. Отримані результати досліджень опрацьовано статистично з використанням відповідних програм.

В процесі роботи над дисертацією не були порушені норми біоетики.

3 розділ «Накопичення і перерозподіл іонів кобальту в організмі карася та щуки» зосереджено на дослідженнях акумуляції кобальту в організмі риби, яка є тканинспецифічна і концентраційно-залежною. Дисертантом встановлено, що зябра, які безпосередньо контактують з водою, продемонстрували найнижчий рівень накопичення кобальту за дії його підвищених концентрацій.

Реакція печінки на токсичний вплив металу має видоспецифічний характер, у карася спостерігається нелінійна відповідь, у щуки наявне концентраційно-залежне акумулювання токсиканту. 14-добова експозиція у розчинах кобальту є достатньою для суттєвого накопичення металу у м'язах риби. При чому найбільше він накопичується у м'язах карася.

У розділі «Особливості ліпідного складу тканин зябер, печінки та м'язів риби за інтоксикації іонами кобальту» розглядаються питання щодо тканинної специфічності розподілу загального вмісту ліпідів в організмі досліджуваних риби. Дисертантом встановлено, що у зябрах карася загальний вміст ліпідів залишається без змін, тоді як у печінці відбувається достовірне накопичення ліпідів. За токсичного впливу іонів кобальту спостерігається односпрямована реакція скелетних м'язів обох видів риби. Показано, що модифікація ліпідного складу в тканинах досліджуваних риби є видоспецифічною та безпосередньо залежить від концентрації іонів кобальту у водному середовищі та тривалості експозиції. Спільною реакцією для карася і щуки є інтенсифікація ліполізу та накопичення проміжних продуктів деградації ліпідів у більшості досліджених тканин.

Автором встановлено, що структурна реорганізація пулу фосфоліпідів клітинних мембран за умов інтоксикації іонами кобальту має виражену видову специфічність. Виявлено спільне для обох видів риби інтенсивну перебудову мембран первинного бар'єра для підтримки їхньої цілісності в умовах прямого контакту з іонами металу.

У п'ятому розділі «Вплив підвищених концентрацій іонів кобальту на стан антиоксидантної системи та пероксидне окиснення ліпідів в організмі риби» розглядаються питання щодо впливу підвищених концентрацій іонів кобальту на антиоксидантну систему та інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів у риби. Фізіологічна відповідь залежить від екологічних та метаболічних особливостей досліджуваних видів риби. Автором доводиться, що карась демонструє високу резистентність до інтоксикації іонами кобальту, а також здатність до антиоксидативної гіперкомпенсації. Щука значно більш вразлива до дії іонів кобальту. Інтоксикація супроводжується інтенсифікацією процесів пероксидного окиснення

ліпідів у всіх досліджуваних тканинах. Але неї зафіксована компенсаторне підвищення загальної антиоксидантної активності у зябрах яка все ж є недостатньою для повної нейтралізації оксидативного стресу.

Отримані результати обґрунтовують доцільність використання щуки як високочутливого модельного об'єкта для ранньої діагностики забруднення водних екосистем важкими металами. Досліджені ферментативні (каталаза, глутатіон-S-трансфераза) та неферментативні (загальний глутатіон) біомаркери є надійними та інформативними індикаторами для оцінки токсичності кобальту для риб.

У шостому розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» автор підводить підсумок отриманих результатів та наводить схеми метаболічних змін в організмі прісноводних риб за дії сублетальних концентрацій кобальту, як підсумок своєї роботи. Крім того широко обговорюються кореляційні зв'язки між всіма дослідженими показниками. Проте за детальним аналізом та узагальненням отриманих результатів автор не надає в цьому розділі рекомендацій з використання біохімічних маркерів для оцінки токсичного впливу забруднювачів у воді, які присутні лише у висновках.

Висновки дисертації сформульовано відповідно до поставленої мети та завдань і відображають основні положення дисертації. Висновки базуються на численних даних експериментальних досліджень та достатньо аргументовані результатами аналітичного та статистичного аналізу. Їх зміст дозволяє отримати достатньо інформації щодо ключових результатів досліджень.

Висновки, сформульовані в дисертації, є достатньо обґрунтованими, базуються на експериментальному матеріалі, відображають завдання, поставлені в роботі, засвідчують наукову новизну та практичне значення проведених досліджень.

Список літератури містить 218 найменувань за темою дисертації (з них 213 латиницею), що цілком достатньо для теоретичного і практичного обґрунтування результатів досліджень, які виконував дисертант.

Повнота висвітлення результатів в опублікованих працях. Основні положення та висновки, наведені у дисертації, достатньо мірою викладено у 15 наукових працях, з яких в тому числі 6 статей у фахових виданнях, 1 з яких індексуються у наукометричних базах даних Scopus, та 9 матеріалів доповідей на міжнародних науково-практичних конференціях. Матеріали дисертаційного дослідження апробовано на всеукраїнських та міжнародних науково-практичних конференціях, за результатами яких опубліковано 9 тез наукових доповідей. Аналіз дисертації свідчить, що наукові результати було отримано здобувачем

особисто. З наукових публікацій, виданих у співавторстві, в дисертації автором використано лише ті положення, що становлять його особистий внесок.

Питання для дискусійного обговорення та зауваження щодо роботи. Позитивно оцінюючи дисертацію в цілому, відмічаючи достатній загальний рівень проведених наукових досліджень, вважаю за доцільне акцентувати увагу на деяких дискусійних питаннях та висловити з цього приводу наступні зауваження та побажання:

В переліку умовних скорочень наводиться ПОЛ (перекисне окиснення ліпідів), хоча в тексті самої дисертації переважає термін пероксидне окиснення ліпідів.

2. Відсутнє узагальнення першого розділу дисертації та невизначені невіршені питання з приводу проведених дисертантом наукових досліджень.

Відомо, що біодоступність та токсичність важких металів, у тому числі іонів кобальту, критично залежать від фізико-хімічних параметрів води – її жорсткості, рН, температури та вмісту розчиненого кисню. Чи відстежувалися ці параметри протягом 14-денного експерименту? Наприклад, яким чином підвищення жорсткості води у природних водоймах могло б вплинути на інтенсивність накопичення кобальту в тканинах риб?

. Чи не могло позначитись на фізіологічний стан риб 14-добове голодування?

На підставі чого досліджувалася лише передня доля печінки? Дослідження проводили на зябрах чи зябрових пелюстках?

6. Чим пояснюється зниження вмісту кобальту у печінці карася за концентрації 0,1 мг/дм³ з подальшим збільшенням його кількості за концентрації 0,25 мг/дм³, що не спостерігалось для щуки?

У модельному експерименті вивчено дію іонів кобальту як ізольованого одиничного чинника. Проте в умовах природних водойм забруднення зазвичай є багатокomпонентним. Спираючись на результати, чи можна спрогнозувати, якою буде реакція антиоксидантної системи риб за умови комбінованої дії кобальту з іншими важкими металами (наприклад, цинку або міді)?

Оскільки поліненасичені жирні кислоти можуть виступати як мішенями для вільних радикалів, так і регуляторами плинності мембран, хотілося б почути думку щодо їхньої ієрархії у цьому процесі. Які саме з досліджених поліненасичених жирних кислот (наприклад, ейкозапентаєнова чи докозагексаєнова) відіграють найбільш критичну роль у формуванні стійкості риб до кобальту?

Для проведення експерименту було обрано 14-денний термін впливу токсиканта. Цей період чудово ілюструє фазу первинної біохімічної відповіді та мобілізації резервів у

риб. Якби експеримент було подовжено на більший проміжок часу, то яких би змін можна було би очікувати в системі антиоксидантного захисту?

Підсумовуючи, слід підкреслити, що наведені зауваження, наявність окремих дискусійних положень не впливають на наукову і практичну цінність одержаних автором результатів і не знижують в цілому позитивної оцінки дисертації.

Загальний висновок. Дисертація Марківа Віктора на тему: «Особливості ліпідного складу та стану антиоксидантної системи прісноводних риб за дії іонів кобальту» є самостійною, завершеною науковою працею, в якій теоретичні положення, висновки та пропозиції характеризуються науковою новизною, є достатньо обґрунтованими, достовірними і свідчать про досягнення поставленої мети дослідження. Дисертація написана українською мовою із дотриманням наукового стилю викладення матеріалу.

Дисертація за структурою, змістом, рівнем і глибиною опрацювання представленого матеріалу, його опублікуванням та апробацією є науковою працею, яка відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» і 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 року, а її автор, Марків Віктор, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» галузі знань 09 «Біологія».

Офіційний опонент завідувач відділу біології відтворення риб Інституту гідробіології НАН України, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, Олександр ПОТРОХОВ

