

До разової спеціалізованої вченої ради ДФ 58.053.057  
Тернопільського національного педагогічного  
університету імені Володимира Гнатюка  
(46027, м. Тернопіль, вул. Максима Кривоноса, 2)

## РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Хатіб Іхаба на тему:

«Фізіолого-біохімічні механізми адаптації коропових риб на прикладі *Danio rerio* до впливу орґанофосфатних та триазинових пестицидів»,  
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань  
09-«Біології» за спеціальністю 091-«Біологія»

Поверхневі води зазнають прогресуючого впливу токсикантів різного генезису. На сьогодні в аграрних районах, як забрудники водних екосистем, на перший план виступають пестициди, що обумовлено інтенсивним використанням їх у сільському господарстві.

Фосфорорганічні, орґанофосфонатні та триазинові пестициди є широко використовуваними агрохімікатами, глобальні ринки яких швидко зростають. Відтак концентрації хлорпірифосу, гліфосату, тербутилазину та їх дериватів у зразках поверхневих вод зростають, особливо в сезони піку агротехнічної активності.

Ускладняється ситуація забруднення водного середовища пестицидами внаслідок їх комплексного використання, так як при цьому можуть спостерігатися комбіновані ефекти (синергія, антагонізм тощо). Тому актуальним є питання оцінки екологічного ризику прісноводних екосистем, які знаходяться під комплексним впливом агрохімікатів.

Оцінка впливу забруднювачів на гідроекосистеми з використанням біологічних показників є більш перспективною через її вищу чутливість, менші витрати та істотніший прогностичний потенціал порівняно з хімічним моніторингом. Використання біомаркерів і біоіндикаторних видів риб дає пряме уявлення про біологічні реакції на забруднювачі та пов'язані з ними ризики для навколишнього середовища та здоров'я

Риба даніо *Danio rerio* (Hamilton, 1822) широко використовується як модель у екотоксикологічних дослідженнях оскільки генетика і фізіологія виду

добре вивчені. Саме даній проблематиці приурочена дисертаційна робота Хатіб Іхаба, в якій автор використовує *D. rerio* як модельний вид для оцінки біологічних ефектів і молекулярних механізмів токсичності пестицидів (раундапу, хлорпірифосу, малатіону та тербутилазину) та їх сумішей.

Дисертаційна робота виконувалась у межах проєкту «Розробка методології інтегральної оцінки біобезпеки забруднення оточуючого середовища пестицидами для цільових та нецільових організмів» (10.2020–12.2022), онкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» №90/02/0270 0120U104364.

Наукова новизна роботи полягає в тому, що автором вперше встановлено, що у *D. rerio* окисний і карбонільний стрес поряд із розладами ендокринної та імунної систем є важливими механізмами токсичності фосфорорганічних пестицидів та хлоротриазинів. Вперше визначено мінімальний набір показників для оцінки ризиків пестицидного забруднення для нецільових організмів, який включає на першому етапі показники імунної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін Vtg), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (LDH), з подальшою деталізацією оцінки стану організму на підставі визначення показників окисного стресу (ТБК-АП, Nrf2, загальної антиоксидантної здатності, GSSG), стрес-гормону кортизолу та ключового ензиму апоптозу Cas3.

Практичне значення одержаних результатів. Автором запропоновано та апробовано мінімальний набір біомаркерів організму данію для інтегральної оцінки біобезпеки забруднення середовища пестицидами, який включає показники імунної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін Vtg), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (LDH) у тканинах смугастого данію. За результатами розробленої схеми використання набору біомаркерів отримано патент України на корисну модель способів оцінки якості води.

Дисертаційна робота Хатіб Іхаба викладена на 171 сторінці комп'ютерного набору, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, отриманих результатів (2 розділи), аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Робота містить 38 рисунків, 5 таблиць. Бібліографічний список складає 294 джерел, з них

292 – англійською мовою.

В огляді літератури дисертантом проаналізовано поширення основних пестицидів у водоймах, розглянуто питання біоаккумуляції фосфорорганічних і триазинових пестицидів та їх впливу на організм риб. Охарактеризовано окисний, карбонільний, нітрозативний стрес у риб за впливу пестицидів. На основі останніх літературних повідомлень розглянуто імуномодулюючі та запальні ефекти фосфорорганічних та триазинових пестицидів та їх вплив на ендокринну систему. Літературний огляд достатньо інформативний, базується на посиланнях останніх років і побудований таким чином, що з нього логічно витікають завдання дослідження.

Розділ «Матеріали та методи» детально висвітлює всі практичні процедури з постановки експериментів та лабораторного аналізу. Автором застосовані сучасні методи: спектрофотометричні (визначення активності ферментів, концентрації продуктів окисної деструкції, морфологічних порушень структури мітохондрій та лізосом), флуоресцентні (визначення утворення активних форм кисню, окисного ушкодження ДНК), імуноферментні (вміст IgM, кортизолу, трийодотироніну), полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (визначення експресії таргетних генів), статистичні методи та методи машинного навчання (кореляційний, дисперсійний, регресійний, теплова матриця (Heat map), дискримінантний (Partial least squares – Discriminant Analysis, PLS-DA), рендом форест Random forest).

Експериментальні результати та їх обговорення подані в розділах 3 та 4.

Третій розділ роботи був приурочений аналізу метаболічних реакцій організму *D. Rerio* на вплив підвищених концентрацій раундапу та хлорпірифосу.

В підрозділі 3.1 автор розглядає системи антиоксидантного захисту печінки даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу. Встановлено, що дія фосфорорганічних пестицидів у екологічно реальних та субтоксичних концентраціях викликає у риб пригнічення антиоксидантів, активацію проокисних процесів та деструкцію біомолекул.

В підрозділі 3.2 дисертант проаналізував стан лізосом та мітохондрій клітин печінки даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу. Показано, що раундап

та, особливо, хлорпірифос викликають істотні зміни у структурі та функціонуванні лізосом та мітохондрій у даніо. В більшості випадків це зниження стабільності лізосомальних мембран, зростання активності катепсину Д, збільшення ступеня набрякання мітохондрій та зниження активності сукцинатдегідрогенази.

У підрозділі 3.3 автор досліджує параметри імунної, гормональної та біотрансформаційної систем даніо за впливу фосфорорганічних пестицидів. Показано, що вплив раундапу та хлорпірифосу викликає активацію імунної відповіді та пригнічення біотрансформаційних процесів, з більш інтенсивним їх проявом за впливу хлорпірифосу, що вказує на вищу його токсичність. Сумісна дія пестицидів автором розцінюється як антагоністична.

У підрозділі 3.4 автор досліджує показники цито- та генотоксичності у тканинах даніо за дії раундапу та хлорпірифосу. Було встановлено збільшення фрагментації ДНК та лактатдегідрогеназної активності у плазмі крові риб, пригнічення ацетилхолінестерази. Автор підсумовує, що раундап та хлорпірифос навіть в екологічно реальних концентраціях викликають ефекти цито- та генотоксичності у риб.

У підрозділі 3.5 Хатіб Іхаб вивчає експресію таргетних генів у печінці даніо за впливу пестицидів. Автор показав, що вплив раундапу та хлорпірифосу викликав пригнічення рівня мРНК RAD51, що забезпечує безпомилкове відновлення дволанцюгових розривів ДНК, у печінці практично у всіх експериментальних групах. Рівень експресії мРНК RAD51 негативно корелював з рівнем ушкодження молекул ДНК у печінці. Пестициди впливали на статеву функцію на що вказує пригнічення експресії гена вітелогеніну. Це потенційно може викликати негативний вплив на зменшення чисельності популяції риб. Також раундап та хлорпірифос окремо та в суміші викликають у даніо істотні зміни на молекулярному рівні, пов'язані із апоптозом, антиоксидантним захистом та розмноженням.

У підрозділі 3.6 автором здійснено інтегральний аналіз реакцій даніо до дії раундапу та хлорпірифосу. Було підібрано оптимальний набір фізіологічних і молекулярних маркерів для оцінки пошкоджувального впливу фосфорорганічних

пестицидів з використанням модельного організму. Стрес-тестування дозволило диференціювати особливості статусу організму залежно від природи діючого чинника та прогнозувати рівень толерантності до новітніх викликів.

У четвертому розділі роботи проаналізовано стресорні системи, цитотоксичність та метаболічні відповіді організму даніо за впливу екологічно реальних та субтоксичних концентрацій малатіону та тербутилазину

В підрозділі 4.1 автор розглядає системи антиоксидантного захисту даніо за впливу тербутилазину та малатіону. Було відмічене збільшення рівня окисненого глутатіону, редокс-індексу та пригнічення ферментів обміну глутатіону, що, як вважає автор, можна вважати перевищенням границі толерантності організму риб та зменшенням його здатності протистояти токсичному впливу пестицидів. Зміни кількості продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків у печінці даніо за впливу тербутилазину і малатіону були взаємнокорельованими.

У підрозділі 4.2 автором було досліджено інтенсивність метаболічних процесів у печінці риб за дії тербутилазину та малатіону. Було відмічене набрякання мітохондрій гепатоцитів з одночасним інгібуванням сукцинатдегідрогеназної активності.

У підрозділі 4.3 дисертантом було проаналізовано експресію таргетних генів печінки даніо за впливу тербутилазину та малатіону. Встановлено, що пестициди індивідуально та в сумішах викликають різнонаправлені зміни у експресії генів, що регулюють відповідь організму на окисний стрес та процеси апоптозу. Разом з тим, рівень кортизолу та трийодотироніну у риб залишався стабільним у порівнянні з контролем.

У підрозділі 4.4 автор вивчав плив тербутилазину та малатіону на морфологічні та функціональні показники лізосом гепатоцитів даніо. Дослідження показали, що тербутилазин та, особливо, малатіон викликали дестабілізацію лізосомальних мембран клітин печінки, що супроводжувалося активацією катепсину Д, за виключенням груп сумісного впливу пестицидів.

Підрозділ 4.5 був присвячений дослідженню цито- та генотоксичності у риб за дії пестицидів. Було відзначено збільшення фрагментації ланцюгів ДНК у

гепатоцитах даніо у більшості досліджуваних групах, як ознаку генотоксичності. Активність лактатдегідрогенази у крові даніо, як показник цитотоксичності, зростала залежно від концентрації. Найбільше значення лактатдегідрогеназної активності було відзначено за впливу суміші токсикантів. Було також відмічено помірну нейротоксичність досліджуваних пестицидів для даніо.

У підрозділі 4.6 було здійснено інтегральний аналіз реакцій даніо до дії тербутилазину та малатіону в екологічно-реальних та субтоксичних концентраціях. Автор вказує на антагоністичну взаємодію тербутилазину та малатіону за умов одночасної присутності у середовищі. Запропоновано сім показників для інтегральної оцінки стану організму, який потенційно зазнає впливу пестицидів, а також для встановлення природи діючого чинника.

П'ятий розділ роботи був приурочений аналізу та узагальненню одержаних результатів. Проведено статистична обробка результатів дослідження з використанням регресійного, факторного, канонічного дискримінантного, кореляційного, кластерного аналізу, рендом форест аналізу тощо. На основі цього здійснено порівняння токсичної дії раундапу, хлорпірифосу, малатіону та тербутилазину на організм даніо з використанням мінімального набору біомаркерів. До мінімального набору ввійшли показники іммуної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін Vtg), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (LDH). Для більш детального аналізу цінним є визначення показників окисного стресу (ТБК-АП, Nrf2, загальної антиоксидантної здатності, GSSG), стрес-гормону кортизолу та ключового ензиму апоптозу Cas3.

Дисертантом було доведено, що раундап, хлорпірифос, малатіон і особливо тербутилазин у тканині печінки індукували утворення активних форм кисню та нітрогену, пригнічували активність антиоксидантів та ініціювали окисне ушкодження біомолекул, що підтверджує прооксидантну природу досліджуваних гербіцидів та інсектицидів. Фосфорорганічні та триазиновий пестициди викликали у даніо ознаки морфо-функціональних порушень мітохондрій та лізосом, пов'язані із порушенням проникності мембран, розладами ланцюга транспорту електронів, розвитком псевдо-гіпоксичного стану та надмірною генерацією активних форм кисню, які в свою чергу на вищих

рівнях біологічної організації можуть проявлятися як метаболічні та імунні розлади. За ознаками морфо-функціональних порушень мітохондрій та лізосом найбільш істотних ушкоджень зазнала група даніо за впливу хлорпірифосу.

Автором наведено узагальнюючу схему реакцій досліджуваних показників на вплив пестицидів. Показано, що дослідження з використанням моделі риб даніо, надають переконливі докази оксидативного стресу, як важливого токсичного механізму та клітинної відповіді за впливу раундапу, хлорпірифосу та їх сумішей в екологічно реальних концентраціях. Досліджувані пестициди та їх суміші викликали у даніо пригнічення антиоксидантів, надлишкове вироблення активних форм кисню, накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів і підвищений рівень фрагментації ДНК. Хлорпірифос був значно токсичнішим, ніж раундап, і додатково викликав нітрозативний і карбонільний стрес. У групах тербутилазину і малатіону ознаки окисного стресу поєднуються із порівняно більш інтенсивними процесами апоптозу та аутофагії, що забезпечує в експонованих тварин більш ефективно виведення продуктів окисного ушкодження, зокрема фрагментованих молекул ДНК. Прояви окисного стресу, особливо істотні за впливу хлорпірифосу та тербутилазину, на рівні організму зумовлюють розвиток ознак гепато- та нейротоксичності.

Одержані дисертантом дані ґрунтовно проаналізовані, обговорені, пов'язані з літературними повідомленнями. Висновки дисертації повністю витікають з експериментальних даних. Заслуговує на увагу опрацювання значної кількості наукової літератури, яка безпосередньо стосується досліджуваної теми. Це свідчить про високу обізнаність, скрупульозність та наукову відповідальність автора.

Разом з тим до роботи можна висловити окремі зауваження та запитання:

- 1. Чому для досліджень було взято два різних за хімічною природою та механізмом дії гербіциди (раундап та тербутилазин)? Чому не взяли, наприклад, два гербіциди групи триазинів? Як Ви можете це обґрунтувати?**
- 2. Чому активність глутатіон-трансферази (GST) як ензиму II фази**

детоксикації зменшується за дії раундапу, тербутилазину та їх сумішей? Як це пояснити?

3. Ви говорите, що пестициди є стрес-чинниками для данію, і ми за низкою біологічних показників це бачимо. Поясніть чому рівень кортизолу (стрес-гормону) практично не змінюється за дії усіх досліджуваних токсикантів та їх сумішей?
4. У роботі сказано, що комбіновані ефекти досліджуваних пестицидів для смугастого данію мали характер антагонізму. Але слід зазначити, що дія суміші тербутилазину та малатіону за окремими показниками (АФК, ТБК-АП, набрякання мітохондрій, активність ЛДГ) призводила до значніших токсичних ефектів, ніж поокремо. Як Ви це можете пояснити?
5. Доцільніше було б статистичний аналіз результатів з розділів 3 та 4 перенести до розділу «Аналіз та узагальнення результатів дослідження».

Проте, зауваження і побажання не зменшують цінність дисертаційної роботи, а лише дають змогу провести цікаву наукову дискусію із зазначеної тематики дослідження.

#### Апробація роботи.

За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 7 праць, в тому числі 4 статті у фахових виданнях, які індексуються у наукометричних базах даних Scopus та/або WoS, 5 матеріалів і тези доповідей на з'їздах та конференціях, 1 патент на корисну модель. Індекс Гірша згідно з наукометричною базою даних Scopus – 4 (author ID:57223683104)

Анотація у повній мірі відображає зміст роботи. Вона не містить тверджень чи ідей, які не наведені в основному тексті дисертації.

Праця написана змістовно, літературною мовою, стиль викладення матеріалу науковий, думки висловлені логічно та послідовно.

На основі всього вище переліченого вважаю, що дисертаційна робота Хатіб Іхаба на тему Фізіолого-біохімічні механізми адаптації коропових риб на прикладі *Danio rerio* до впливу органофосфатних та триазинових пестицидів», яка



подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своїм науковим рівнем та практичною цінністю, змістом та оформленням відповідає 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 12.01.2022 р. №44 та сучасним вимогам до оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

**Рецензент:**

*кандидат біологічних наук,*

*доцент кафедри хімії та методики її навчання*

*Тернопільського національного педагогічного*

*університету імені Володимира Гнатюка*

*Володимир ХОМЕНЧУК*

