

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА
на дисертаційну роботу Горин Оксани Ігорівни
«Фізіолого-біохімічні реакції коропових риб на вплив новітніх
біоризиків», представлену до захисту на здобуття ступеня доктора
філософії за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Проблема цвітіння водойм та низка проблем, пов'язаних з токсичним впливом метаболітів ціанобактерій на біоту давно вивчається науковцями всього світу. Особливої гостроти ця проблема набуває у зв'язку з глобальним потеплінням, що призводить до істотних трансформацій гідроекосистем та зміни видового складу угруповань, зокрема, поширення ціанобактерій представників ряду *Nostocales* в поверхневих водах Європи і збільшення кількості випадків цвітіння води за їх участі (Tagani et al. 2015). Показано, що очікується поширення *Nostocales* в нові місця проживання. Спостерігається поширення *Raphidiopsis raciborskii* за останні десятиліття, особливо в зонах з помірним кліматом (Rzymski et al. 2018), що пояснюється високою фенотиповою пластичністю, зміною клімату та антропогенною евтрофікацією (Cirés and Ballot 2016). Водойми зі стабільно підвищеним температурним режимом (напр. водойми-охолоджувачі атомних чи теплових електростанцій) забезпечують сприятливе середовище для експансії особливо небезпечних видів ціанобактерій. Останнім часом особливу увагу дослідників привернули такі види, як *Raphidiopsis raciborskii*, *Aphanizomenon gracile*, *Dolichospermum flos-aquae*, які здатні продукувати сильнодіючі токсини, а тому є особливо небезпечними для більшості представників біоти гідроекосистем. Варто відзначити, що ці види є термофільними, а тому вкрай важливо прогнозувати їх подальшу експансію у водоймах України в умовах глобального потепління та передбачати ефекти їхнього впливу на гідроекосистеми в цілому.. Тому актуальність роботи не викликає сумнівів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах держбюджетних тем МОН України (конкурс проєктів наукових робіт та науково-технічних (експериментальних) розробок молодих вчених) № МВ-1 «Розробка та валідація нових методів оцінки глобальних та локальних біоризиків довкілля» (№ державної реєстрації 0117U006801, 2017–2019 р.р.) та № МВ-2 «Розробка молекулярної тест-системи для оцінки біобезпеки ціанотоксинів та фармацевтиків» (№ державної реєстрації 0120U101544 (2020–2022 р.р.).

Наукова новизна. Встановлено присутність ціанобактерій *Raphidiopsis raciborskii* та *Aphanizomenon gracile*, які є продуцентами циліндропермопсину, у водоймах Західної України. Обґрунтовано наявність у водоймах нижче та вище дамби ГЕС додаткових пошкоджуючих чинників, якими, зокрема, можуть виступати метаболіти ціанобактерій. Показано, що реакції молекулярних маркерів ізольованих клітин коропа *in vitro* свідчать про токсикологічний ризик для прісноводних риб з боку штамів *Raphidiopsis raciborskii* як з українських, так і з польських водойм, незважаючи на те, що вони не продукують циліндропермопсину. Продемонстровано, що токсичність циліндропермопсину є результатом стеричної та функціональної взаємодії гідроксильної та гуанідинової груп та може бути опосередкована метаболітами альготоксину, на що вказують результати досліджень з використанням відповідних модифікацій його синтетичних аналогів. Досліджено наявність поліметокси-1-алкену (як одного з біологічно активних вторинних метаболітів у мікроводоростях) у харчових добавках на основі біомаси спіруліни та хлорели та оцінено потенційний тератогенний ефект їх ліпофільних фракцій на ембріонах *Danio rerio*.

Практичне значення одержаних результатів.

Визначено основні показники молекулярних стресорних та детоксикаційних систем коропових риб, які можна використовувати для оцінки

якості водного середовища та розроблено алгоритм її проведення (Фальфушинська та Горин, 2018). Цей алгоритм впроваджено у вигляді науково-практичних рекомендацій та методик у діяльність природоохоронних та водопостачальних організацій Тернопілля (у тому числі комунального підприємства «Тернопільводоканал», Національного природного парку «Дністровський каньйон» та Держуправління екології в Тернопільській області), може служити важливим аргументом у оцінці наслідків впливів альготоксинів на живі організми. Результати досліджень також впроваджено в освітній процес на хіміко-біологічному факультеті та факультеті фізичного виховання Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка

Повнота викладення основних наукових положень та висновків в опублікованих наукових працях. За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 17 праць, в тому числі 5 статей у фахових виданнях, які індексуються у наукометричних базах даних Scopus та/або WoS, розділ колективної монографії, 10 матеріалів і тези доповідей на з'їздах та конференціях, 2 патенти на корисну модель. Індекс Гірша згідно наукометричної бази даних Scopus – 6 (author ID: 57193336903).

Апробація результатів роботи. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 2 патенти на корисну модель, основні тези доповідались на міжнародних та всеукраїнських конференціях, зокрема: XIV, XV, XVI Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів “*Youth and Progress of Biology*”: (м. Львів, 10–12 квітня 2018, 9–11 квітня 2019 р., 27–28 квітня 2020 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «*Тернопільські біологічні читання 2018*» (м. Тернопіль, 19–21 квітня 2018 р.); XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка (з міжнародною участю) (м. Київ, 27–30 травня 2019 р.); XII Українському біохімічному конгресі (м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.);

міжнародній конференції «*Lakes & Reservoirs: Hot Spot and Topics in Limnology*» (м. Мікоржин, Польща, 17–20 вересня 2019 р.); III міжнародній науково-практичній конференції «*The Problems Of Functioning And Bioproductivity Impruvment Of Water Ecosystems*» (м. Дніпро, 25–27 березня 2020 р.); XII Всеукраїнській конференції «Молоді вчені 2021 – від теорії до практики» (м. Дніпро, 25 березня 2021 р.); конференції-конкурси молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021» (м. Київ, 20–21 травня 2021 р.).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 167 сторінках комп'ютерного набору, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення (3 розділи), узагальнень, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Робота містить 19 рисунків, 6 таблиць. Бібліографічний список складає 297 джерел, з них 222 – англійською мовою.

У «Вступі» дисертантка показує актуальність роботи, стисло висвітлює сучасний стан вивченості теми, обґрунтовує необхідність її виконання, чітко формулює мету та завдання досліджень, вказує наукову новизну, практичне значення виконаної роботи і апробацію результатів, наведених у дисертації, її обсяг і структуру. Оксана Ігорівна відзначає, що водяні тварини адаптуються до сучасних умов існування у антропогенно-змінених водоймах. Але разом з тим, особливості антропогенного тиску, спонтанність, імпульсність та комплексна дія численних чинників, що реалізується на тлі змін клімату, вимагають нових підходів у оцінці діапазону резистентності організму, а також стратегії компенсаторних процесів. Біологічний вплив цих множинних стресорів не може бути прогнозований на підставі визначення вмісту окремих забруднювачів і потребує застосування чутливих і коректних біомаркерів для оцінки екологічної ситуації (Bhandari and Lynes 2019; Lionetto, Caricato, and Giordano 2019).

У Розділі I «Сучасні методологічні підходи до оцінки стану водного середовища» Оксана Ігорівна дає чітке визначення поняття «якість середовища», причому всебічно аналізуючи різні літературні джерела. Далі вона детально описує чинники, які істотно знижують якість навколишнього середовища для більшості гідробіонтів. Дисертантка наголошує на необхідності застосування серед методів оцінки якості води таких, що не тільки забезпечать об'єктивну оцінку стану водних екосистем, а й дозволять спрогнозувати їх здатність забезпечити існування та відтворення біоценозів, притаманних даним типам водойм (Яцик А. В. та Шевчук В. Я., 2006). Кількісними показниками впливу забруднювачів на біосистеми можуть виступати біомаркери – показники, що характеризують взаємодію організму з пошкоджуючими чинниками різної природи (фізичної, хімічної, біологічної тощо) і можуть бути використані для визначення ступеня впливу, глибини змін та оцінки сприйнятливості організму до таких ефектів. Оксана Ігорівна відзначає, що біомаркери розширюють розуміння процесів, за допомогою яких речовини або їх сполуки поглинаються і трансформуються в організмі, а раннє виявлення токсичних ефектів на клітинному та молекулярному рівнях є ключем до розуміння можливих шляхів нівелювання їх впливів (Lionetto, Caricato, and Giordano 2019), що пояснює швидкі темпи розвитку цього напрямку досліджень. Далі проаналізовані три групи біомаркерів: стресу, генотоксичності та ефекту. Підбиваючи підсумки аналізу проблеми, авторка доходить висновку, що, незважаючи на наявність великої кількості інформації щодо впливів ціанотоксинів (особливо мікроцистину) на різні групи організмів, підбір біомаркерів та їх інтерпретація продовжує залишатися одним з актуальних для вивчення питань.

Розділ 2 «Матеріали та методи дослідження» – детально описані місця відбору зразків для дослідження (наведено кольорову карту місць відбору проб), дана характеристика піддослідним групам риб *Carassius auratus gibelio*,

Danio rerio та *Cyprinus carpio*. Достатньо повно описані умови утримання риб та проведення експериментів. Описано методику виділення ізольованих гепатоцитів, біохімічні методи досліджень, зокрема, визначення параметрів окисного ушкодження, активності супероксиддисмутази, каталази, активності утворення активних форм кисню у розчинній фазі гомогенату тканин печінки та/або ізольованих гепатоцитах корошових риб, вмісту окисних модифікацій протеїнів та ліпідів тощо.

Наведена інформація про методи визначення цито- та генотоксичності, маркерів апоптозу, нейротоксичності, маркерів ендокринних розладів, параметрів енергетичного обміну, дослідження тератогенного ефекту. Описані методи аналізу дослідних зразків води, цінки токсичності *in vitro*. Достатньо описані математичні методи обробки даних, зокрема, Оксана Ігорівна використовувала дискримінантний та двофакторний аналіз ANOVA, оцінку взаємозв'язків між окремими показниками тварин здійснювала за допомогою факторного (метод головних компонент, МГК) та МГК з NIPALS алгоритмом, групову приналежність окремих екземплярів тварин – за сумою показників з використанням МГК (центроїдний груповий аналіз) та МГК з NIPALS алгоритмом.

У Розділі 3 «Поширення ціанобактерій ряду *Nostocales* у водоймах західної України та вплив їх метаболітів на корошових риб *Carassius auratus gibelio* (*in vivo*)» проаналізовано поширення та токсичність *Raphidiopsis raciborskii* у водоймах-охолоджувачах електростанцій. Пошукачкою було досліджено наявність *R. raciborskii* та інших ціанобактерій, що належать до роду *Nostocales*, *Chroococcales* та *Oscillatoriales*, у двох локаціях Західної України – водосховищі Касперівської гідроелектростанції та ставку-охолоджувачі Хмельницької атомної електростанції. Оскільки експансія потенційно небезпечних ціанобактерій почалася з тропічних та субтропічних широт, вибір водойм для дослідження базувався на їх температурному режимі. Наведена детальна інформація щодо фізико-хімічних параметрів води із водойм

Касперівської ГЕС та Хмельницької АЕС (табл. 3.1). Визначена частка кожного ідентифікованого штаму в загальній масі фітопланктону та ціанобактерій (табл. 3.3). Проведені аналізи дозволили визначити двох основних продуцентів мікроцистину: *M. aeruginosa* та *P. agardhii*. Визначені показники окисного стресу в печінці *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки, Касперівського водосховища та річки Серет нижче дамби. З'ясовано стан клітинних тіолів печінки *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки, Касперівського водосховища та річки Серет нижче дамби.

Визначені показники цито- та генотоксичності карася *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки, Касперівського водосховища та річки Серет нижче дамби: ушкодження ланцюгів ДНК, кількість клітин з мікроядрами, холінестеразна активність, вітелогенін, загальна активність катепсину, вільна активність катепсину, каспаза, лактатдегідрогеназа. Наведені результати центрального групового аналізу біомаркерів карася *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки, Касперівського водосховища та річки Серет нижче дамби (рис. 3.4). В кінці розділу авторка доходить висновку, що риби, які населяють водойми поблизу дамб, виявляють тенденцію до порушень системи антиоксидантного захисту та проявів цитотоксичності порівняно з рибами з референтних водойм. Проте відсутність узгодженості у реакціях як в межах одного виду (Gnatyshyna et al. 2020; Khoma et al. 2021b), так і в міжвидових, свідчить про сумарний ефект впливу кількох пошкоджуючих факторів, одним з яких, ймовірно, виступають токсичні метаболіти ціанобактерій.

Розділ 4 «Токсичні ефекти впливу *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii* на коропових риб (*Cyprinus carpio*) в умовах *in vitro*». Дисертанткою було досліджено токсичність клітинних екстрактів штамів *R. raciborskii*, виділених співробітниками Познанського медичного університету (Польща) з водойм Польщі та України (табл. 4.1). Результати досліджень свідчать, що реакція показників окисного стресу на вплив екстрактів *R. raciborskii* залежала від походження штаму. Рівень внутрішньоклітинних АФО збільшувався при дії

всіх екстрактів, окрім екстракту UA1 при концентрації 1 мкл/мл. Реакція КАТ відрізнялася в залежності від подразника і його концентрації. Визначені показники оксного стресу у гепатоцитах *C. carpio* за впливу екстрактів штамів *R. Raciborskii* із водойм Західної Польщі та Західної України (рис. 4.1), встановлено загальний вміст глутатіону; активність глутатіон-S-трансферази, вміст металотіонеїнів у гепатоцитах *C. carpio* за впливу екстрактів штамів *R. raciborskii* із водойм Західної Польщі та Західної України (рис. 4.2); стабільність лізосомальних мембран еритроцитів; активність холінестерази у мозку; активність лактатдегідрогенази у гепатоцитах *C. carpio* за впливу екстрактів штамів *R. raciborskii* із водойм Західної Польщі та Західної України (рис. 4.3). Визначені показники окисного стресу та цитотоксичності у гепатоцитах *C. carpio* за впливу синтезованих аналогів циліндропермопсину (рис. 4.5). Наведено результати інтегрального аналізу показників гепатоцитів коропа за впливу синтезованих аналогів циліндропермопсину (рис. 4.6).

Авторка доходить висновку, що пов'язані з гуанідином NH-групи, гідроксил та урацил, які є проксимальними у досліджуваних молекулах, можуть взаємодіяти через внутрішньомолекулярні водневі зв'язки, і ці функціональні групи мають можливість формувати специфічні взаємодії зі своїми біомолекулярними мішенями, що потенційно може сприяти зниженню полярності середовища, роблячи молекули більш ліпофільними і збільшуючи мембранну проникність (Kuhn, Mohr, and Stahl 2010), тим самим призводячи до підвищеної цитотоксичності та посилення окисного стресу.

Розділ 5 «Визначення токсичності харчових добавок на основі хлорели і спіруліни за реакціями молекулярних маркерів *Danio rerio (in vivo)*». Досліджено вмісту ПМА в харчових добавках хлорели і спіруліни та дана оцінка токсичності виділених з них ліпофільних фракцій в зв'язку з потенційним ризиком такого шляху отруєння для людини. Досліджено тератогенний ефект ліпофільних фракцій харчових добавок на основі хлорели

(C1–C10) на ембріони *Danio rerio* ($n = 6$) при статичному впливі протягом 120 год. (табл. 5.2). Досліджено вплив ліпофільних фракцій, одержаних з харчових добавок на основі хлорели та спіруліни на продукування активних форм оксигену, пероксидне окислення ліпідів та активність каталази і глутатіон-S-трансферази у тканинах печінки *Danio rerio* (рис. 5.2). Встановлено вплив ліпофільних фракцій, одержаних з харчових добавок на основі хлорели та спіруліни на ушкодження ниток ДНК у тканинах печінки, частоту мікроядер в периферичних еритроцитах і активність холінестерази в мозку *Danio rerio* (рис. 5.3).

Показано, що 60 % та 31 % фракцій, одержаних з преперитів на основі хлорели та спіруліни відповідно спричиняли підвищення активності холінестерази у гомогенаті мозку даніо, що свідчить про наявність у даних зразках сполук, які викликають порушення холінергічного гомеостазу, що призводить до деградації ацетилхоліну та зниження регуляції його рецепторів (Soreq 2001). У свою чергу, дії 61,5 % фракцій спіруліни і однієї фракції хлорели були пов'язані зі зниженням активності холінестерази, що може бути спричинено підвищенням рівня ацетилхоліну та надмірною стимуляцією холінергічної активності (Mersey et al. 2012).

Розділ 6 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» є заключним, де авторка підбиває підсумки дослідженням та намагається узагальнити отримані результати. Наведено результати інтегрального аналізу біомаркерів карася *C. auratus gibelio* з контрольної популяції, Касперівського водосховища та річки Серет нижче дамби методом головних компонент з NIPALS алгоритмом (рис.6.1). Дана загальнена схема реакції риб на вплив біоактивних сполук ціанобактерій та їх аналогів (рис. 6.2). Обчислені коефіцієнти варіації біомаркерів корошових риб за впливу досліджуваних чинників (рис. 6.3).

Таким чином, пише Оксана Ігорівна, результати наших досліджень синтетичних аналогів циліндроспермопсину, сирих екстрактів культур

ціанобактерій та фізіолого-хімічних показників середовища їх існування дозволили розкрити особливості фізіолого-біохімічних реакцій коропових риб на цей тип поллютантів, що є надійним підґрунтям для розробки методики ранньої детекції токсичних метаболітів ціанотоксинів та їх аналогів.

Висновки в цілому сформульовані вдало, вони конкретні та логічно випливають зі всього змісту роботи та віддзеркалюють її суть.

Список використаних джерел оформлений згідно з чинними вимогами.

Наведені «Додатки» дозволяють глибше розібратися в проведених дослідженнях та з'ясувати певні нюанси.

Водночас варто відзначити і низку недоліків роботи Оксани Горин.

Сама назва роботи досить невдала і некоректна. Адже не можуть риби реагувати на ризики, бо ризик – це те, чого ще немає. На ризики реагують лише ризикологи та менеджери ризиків.

Та і самі чинники, вплив яких досліджувала Оксана Ігорівна, важко назвати новітніми. Тут явно авторка опинилась в полоні красивої на її думку назви, яка не відповідає дійсності.

«Оскільки біологічні та біохімічні реакції риб на токсичні речовини часто схожі з реакціями інших вищих хребетних, вони є альтернативними біоіндикаторними видами» (с.18) – що означає альтернативними видами? Та і самі Риби не належать до вищих Хребетних.

«...цвітіння ціанобактерій ..» (с.36) – цвітуть не ціанобактерії, а водойми за бурхливого розвитку ціанобактерій та низки видів фітопланктону.

Чому Данію реріо утримували за температури 18⁰С (оптимальна температура для цього виду 20-26⁰С), а гомогенат їхнього мозку досліджували за 25⁰С ?

Наскільки коректно вважати референтними умови рибного господарства, розташованого в незабрудненій місцевості (49°49 п.ш., 25°23 с.д.) (с. 51) для порівняння з річковою ділянкою чи водосховищем» ?

У роботі є низка вкрай невдалих виразів: «токсичних видів ціанобактерій» «ціанобактерії були домінуючою фракцією»; «подальші дослідження були спрямовані на визначення життєвого статусу гідробіонтів дослідних водойм, зокрема карася сріблястого *Carassius auratus*», (яких ще гідробіонтів?). «Окислювальні та цитотоксичні зміни, які спостерігаються у риб, можуть свідчити про потенційну небезпеку дамб ГЕС для водних організмів». Як самі дамби (безпосередньо) впливають на це?

Дисертантка вживає поняття «аклімація» і «акліматизація» як синоніми, хоч це різні поняття. «Для перевірки впливу географічного чинника на токсичні ефекти продуктових сполук». Як географічний чинник може впливати?

Наскільки дані, отримані на рибах, можна еstrapолювати на людину?

«Тому подальші дослідження повинні акцентуватися на оцінці впливу потенційно токсичних синьо-зелених водоростей на риб *in situ* та *in vivo* з подальшою екстрполяцією одержаних даних на людину». Наскільки це коректно?

Бажано більш чітко розмежовувати результати, отримані самою дисертанткою, та іншими авторами. І хоч Оксана Ігорівна і посилається на авторів, проте не завжди вдається чітко розмежувати, про чиї саме дані йде мова.

Перший висновок – не зовсім ясно, хто це з'ясував.

Проте вказані недоліки істотно не знижують наукову цінність та практичного значення проведеного дослідження.

Дисертаційна робота особливо актуальна в умовах глобальної зміни клімату, адже зміна видового складу та домінантних груп істотно впливає на склад та структуру гідроекосистем, породжуючи нові ризики зростання токсичного впливу не лише антропогенного, а й природного походження, зокрема ціанотоксинів.

Загальний висновок. Враховуючи викладене вище, вважаю, що дисертаційна робота «Фізіолого-біохімічні реакції коропових риб на вплив новітніх біоризиків» є самостійним завершеним науковим дослідженням, в якому вирішено конкретну наукову проблему, вона має певне наукове і практичне значення, відповідає галузі знань 09 «Біологія» спеціальності 091 «Біологія» та Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах), який затверджений Постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року №261 (зі змінами і доповненнями від 03 квітня 2019 року №283), в тому числі вимогам, передбаченим пунктом 10 Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 року №167 (зі змінами), а її авторка Горин Оксана Ігорівна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія».

Офіційний опонент

професор кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор біологічних наук, професор

 Володимир Гандзюра

