

ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Мар'яна ЮЗЬВЯКА**
«Вплив наночитратів Zn, Ge і Se на біохімічний профіль
крові кролів за норми і теплового стресу»,

подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань
09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність обраної теми. Беручи до уваги глобальні зміни клімату, що супроводжуються зростанням температури в доквіллі, вивчення адаптаційних можливостей та способів підвищення адаптаційного потенціалу живих організмів до толерування підвищеної температури, є актуальним питанням. У тваринництві проблема теплового стресу є однією з ключових. Кролі особливо чутливі до підвищеної температури через біологічні особливості їхнього організму. Підвищена температура доквілля призводить до порушення терморегуляції, негативних змін фізіологічних і біохімічних процесів та збільшення інтенсивності оксидативного стресу в організмі тварин. У цій роботі, дисертант зосередився на вивченні захисного впливу низки мікроелементів на кролів, підданих впливу помірного та сильного температурних стресів. Мікроелементи, такі як Zn, Ge і Se, відіграють важливу роль у метаболічних процесах тварин, а також беруть участь у адаптаційних можливостях тварин за впливу різних несприятливих факторів. Одним із їхніх недоліків є низька біодоступність або, навпаки, токсичність за вживання у типовій неорганічній чи органічній формі. Одним зі способів збільшення біодоступності, відповідно, й зменшення дозування та токсичності є використання мікроелементів у формі наносполук, що й лягло в основу дисертаційної роботи. Нанотехнології – це тренд сучасної біології та медицини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є частиною наукової тематики Інституту біології тварин НААН, що була включена у програму наукових досліджень НААН «Фізіологія та біохімія тварин» на рівні фундаментальної тематики «Дослідити метаболічні процеси у формуванні продуктивності кролів за дії нових біологічно активних речовин з метою одержання екологічно безпечної продукції» (ДР 0121U108833).

Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота характеризується високим ступенем обґрунтованості наукових положень. Автор базує дослідження на комплексному підході, що включає сучасні гематологічні, біохімічні та статистичні методи аналізу. Для досягнення поставленої мети дисертантом вдало сплановані та якісно проведені експерименти, які дозволили отримати вичерпні відповіді на поставлені завдання. Дослідження проведено на достатній кількості тварин із використанням точних доз наночитратів цинку, селену та германію, що забезпечує репрезентативність результатів. Усі висновки підкріплені результатами з високим рівнем вірогідності, що підтверджує надійність отриманих даних. Висновки безпосередньо випливають із результатів

експериментів, проведених у двох серіях (за помірною та сильною тепловою стресу), та повністю відповідають поставленим завданням. Робота написана державною мовою. Основні положення і висновки роботи у повній мірі відповідають спеціальності 091 Біологія.

Структура дисертації. Загальний обсяг дисертації – 226 сторінок, набраних на комп'ютері відповідно до вимог до оформлення дисертації. Складається робота зі анотації двома мовами, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, переліку використаних джерел, який включає 446 джерел. Робота включає 7 рисунків та 31 таблицю.

Анотація коротко та адекватно висвітлює зміст всіх розділів дисертації.

Розділ 1 «Огляд літератури» містить ґрунтовний аналіз світового та вітчизняного досвіду щодо впливу теплового стресу на кролів та біологічної ролі Zn, Se і Ge. Окрему увагу приділено перевагам нанотехнологій у тваринництві. Загалом, дисертантом системно проаналізована достатня кількість літературних джерел, зокрема останніх років, що вказує на те, що дисертант добре володіє матеріалом.

Розділ «**Матеріали та методи дослідження**» детально описує усі експериментальні процедури та методи досліджень, використані у роботі. Зокрема, чітко описано дизайн експериментів, фізико-хімічні характеристики наночастинок та методики визначення про-/антиоксидантного статусу, біохімічного аналізу крові та гематологічного аналізу. У роботі використано широкий спектр методів (спектрофотометричні, гематологічні методи, атомно-абсорбційний аналіз, методи математичної статистики). Методи підібрані адекватно та дозволили дати відповідь на поставлені завдання.

Розділ 3 - найбільший розділ, де проаналізовано вплив наночастинок на морфологію крові, ліпідний та мінеральний обмін, антиоксидантний захист за різних температурних режимів. Встановлено, що найбільш ефективними для пом'якшення стресу є наночастинок цинку та селену.

У **розділі 4** наведено детальний аналіз та узагальнення результатів дослідження.

На основі результатів проведеного дослідження дисертантом сформульовано **7 висновків**, які відповідають поставленим завданням.

У **практичних рекомендаціях** пропонуються шляхи впровадження наночастинок у промислове кролівництво.

Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та отриманих результатів. Серед низки отриманих результатів дослідження відзначають найбільш вагомі та отримані вперше. Вперше встановлено комплексний вплив наночастинок Zn, Ge та Se на біохімічний профіль крові кролів саме в умовах теплового стресу різної інтенсивності. Вперше детально описано зміни у фосfolіпідному складі крові та мінеральному профілі тканин (печінки, нирок, м'язів, шерсті) кролів за дії наночастинок у стресових умовах. Доведено, що наночастинок Zn та Se значно ефективніше підвищують активність ключових

ензимів (СОД, КАТ, ГП) та вміст відновленого глутатіону порівняно з традиційними формами елементів, що допомагає нейтралізувати наслідки оксидативного стресу. Обґрунтовано доцільність використання наночастинок мікроелементів як високоефективних адаптогенів для підвищення резистентності організму кролів до високих температур довкілля

Повнота викладу основних наукових положень відповідає встановленим вимогам Міністерства освіти і науки України. За результатами дисертації опубліковано 21 наукову працю, у тому числі 5 статей у фахових виданнях, з них 2 статті – у виданнях, які індексуються у базі даних Scopus, та 3 статті у фахових журналах категорії Б, 1 розділ монографії, 14 матеріалів і тез доповідей на з'їздах і конференціях, отримано деклараційний патент. Аналіз тексту дисертації не вказує на те, що в дисертаційній роботі може бути наявний плагіат чи фальсифікації; у подачі матеріалу простежується особистий стиль автора.

Дискусійні питання, побажання та зауваження:

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є ряд питань дискусійного або уточнювального характеру, а також зауважень до оформлення.

1. У вступі відсутні посилання на літературні джерела, які описують вплив цинку, селену та германію на тварин, лише є фрази з «літературних джерел...» – ці фрази мали б бути підкріплені точним цитуванням цих джерел.
2. Багато суперечностей в огляді літератури.
 - «Оптимальна температура довкілля для кролів становить від 18 до 21 °С, а рівень вологості – від 55 до 65 % [279]. Нормальна температура тіла кролів є у межах від 38,5 до 39,5 °С, а індивідуальна різниця коливається від 0,5 до 1,2 °С. Температурний діапазон, оптимальний для росту і розвитку організму кролів є в межах від 15 до 25 °С за відносної вологості 55 – 65 % [258]». То яка все-таки оптимальна температура для кролів – 18 – 21 °С чи 15 до 25 °С?
 - Інша суперечність: «У клітинах ссавців цинк присутній виключно як двовалентний катіон (Zn^{2+}), він не бере участі в окисно-відновних реакціях за фізіологічного функціонування клітини [129]. Проте біологічну активність проявляють вільні іони (Zn^{2+}), які взаємодіють з різними ензимами та молекулами забезпечуючи свої функції» – то все-таки іони Zn^{2+} - активні чи ні?
3. Невірні цитування:
 - «Встановлено, що токсичність наночастинок селену є нижчою у три рази, ніж органічного селену, і в сім разів нижча, ніж неорганічного селену [362]», але це джерело описує ефекти наночастинок цинку. [362] - Shafi B. U. D., Kumar R., Jadhav S. E., Kar J. Effect of zinc nanoparticles on milk yield, milk composition and somatic cell count in early-lactating barbari does. *Biological Trace Element Research*. 2020. Vol. 196. P. 96–102. DOI: 10.1007/s12011-019-01900-6. PMID: 31595398
4. У описі дизайну експериментів варто було вказати, як розраховували розмір вибірки (sample size) – це критично, щоб відповідати принципам 3R.

5. Не зрозуміло, чому обрали тварин різної маси для оцінки помірнього та сильного теплового стресу (Тварин для дослідження формували у групи по 6 тварин (контрольна і три дослідні), середньою масою тіла 980 ± 50 г за помірнього теплового стресу та 1200 ± 50 г за умов сильного теплового стресу). Варто було б згадати, чи цей факт міг вплинути на отримані ефекти.
6. У описі методів не обґрунтовано вибір доз наносполук мікроелементів; при цьому була обрана лише одна доза кожного мікроелементу для досліджень. Водночас у підсумку літературного огляду наводиться фраза «проте відсутнє дозування цих мікроелементів, залежно від інтенсивності теплового стресу на організм кролів, що потребує проведення ґрунтовних наукових досліджень». З цього очікувалося, що будуть вивчатися дозозалежні ефекти сполук мікроелементів або принаймні чітко обґрунтовано, звідки дозування.
7. При формуванні груп для досліджень стать кролів не враховували. Але чи важливий у кролів загалом вплив статі, зокрема, на стійкість до температури?
8. В описі методів – там, де забір крові (ст. 57) – не зрозуміло, де визначали активності антиоксидантних ферментів – це цільна кров? Чи то в клітинах крові чи в плазмі? (там до опису визначення активності каталази – згадуються гемолізати еритроцитів? – тоді як їх отримували?)
9. Опис методів, Ст. 57. Не вказано, як отримували плазму.
10. Якщо загальний білок визначали на аналізаторі, то для чого ще міряли білок методом Лоурі?
11. Чому при збільшенні температури утримання одночасно збільшували вологість?
12. Чи підвищення вмісту еритроцитів та гемоглобіну за споживання досліджуваних наночастинок – знаходилося у показниках норми для кролів? Чи навпаки – це було вище норми, оскільки як ми знаємо для організму людини, підвищення вмісту гемоглобіну та еритроцитів – то не завжди добре, а може бути наслідком втрати води чи гіпоксії.
13. Як можна пояснити зростання вмісту гранулоцитів за вполювання наночастинок мікроелементів?
14. Пояснення змін у рівні холестеролу у крові (зниження) за споживання наносполук цитратів цинку, селену та германію – розмите і незрозуміло, як пов'язане з іншими показниками. Це потребує глибшого пояснення.
15. На які ферменти крові міг впливати цитрат цинку, що призводило до зниження вмісту гідропероксидів ліпідів?
16. Неестерифіковані жирні кислоти (НЕЖК) – часто є маркером не лише підвищеного ліполізу, а й небажаних метаболічних змін (свідчать про інтенсивний розпад жирової тканини та порушення ліпідного обміну). Тому підвищення вмісту НЕЖК за впливу наночастинок цинку цитрату могло бути не лише позитивним ефектом, а й виявом токсичної дії.
17. В розділі «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» – власне узагальнення дуже мало. Хотілося б у цьому розділі бачити більше порівняльного аналізу щодо захисного впливу наносполук цитратів цинку, германію та селену на тлі помірнього та сильного теплового стресу у кролів

– у представленому вигляді спочатку просто аналізується вплив на тлі помірному стресу, а потім – на тлі сильного теплового стресу. А чи є відмінності на тлі стресу різної інтенсивності – порівнянь практично немає. Також варто було б підсумувати, як гематологічні та біохімічні зміни можуть бути пов'язані між собою. Наявність узагальнювальної схеми чи схем дозволимо б чіткіше зрозуміти механізми дії досліджуваних сполук.

18. Для того, щоб чітко дати відповідь, що є різниця у дії наносполук на тлі теплового стресу різної інтенсивності – варто було б провести двофакторний аналіз (один фактор – інтенсивність стресу, другий фактор – наносполука). Аналіз принципних компонент дозволив би чітко виокремити чи є кластери показників, які найбільш чутливі до певної наносполуки.

Наведені коментарі не знижують цінність роботи та не впливають на загальну оцінку.

Висновок

Загалом, вважаю що, за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем і практичним значенням дисертаційна робота **Юзв'яка Мар'яна Осиповича «Вплив наноцитратів Zn, Ge і Se на біохімічний профіль крові кролів за норми і теплового стресу»**, подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії, оформлена відповідно до наказу МОН України від 12 січня 2017 року № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» та відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., №44 та Постанови Кабінету Міністрів України «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів» від 03.05.2024 р. № 507, а здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія.

Опонент
доктор біологічних наук, професор,
завідувач кафедри біохімії та біотехнології
Карпатського національного університету
імені Василя Стефаника

Марія БАЙЛЯК

