

ВІДГУК

офіційного опонента ПОЛІЩУКА ОЛЕКСАНДРА ВАСИЛЬОВИЧА на дисертаційну роботу НЕЗБРИЦЬКОЇ Інни Миколаївни «ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОNUВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ CHLOROPHYTA ТА CYANOPROKARYOTA ЗА УМОВ ПІДВИЩЕННЯ ТЕМПЕРАТУРИ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.17 – гідробіологія.

Дисертацію присвячено дослідженням фізіологічно-біохімічних змін у поширеніх у водоймах України представників Chlorophyta та Cyanoprokaryota у відповідь на культивування за підвищених значень температури. Метаболізм Chlorophyta та Cyanoprokaryota характеризується високою гнучкістю у пристосуванні до мінливих умов навколошнього середовища. Разом з тим, різні види мають різний адаптивний потенціал і відрізняються за оптимальними значеннями абіотичних факторів. Глобальна зміна клімату призводить до потепління, яке пов'язане не тільки з циклами сонячної та вулканічної активності, а й з накопиченням парникових газів, зумовленим антропогенным впливом. Дослідження реакції метаболізму поширеніх гідробіонтів важливе для прогнозування кількісних і якісних змін видового складу за умов підвищення температури. З іншого боку, дослідження особливостей реакції водоростей та ціанобактерій на підвищення температури важливе для розуміння фундаментальних характеристик їх функціонування, зокрема взаєморегуляції основних біоенергетичних процесів – дихання і фотосинтезу – в процесі пристосування до зміни абіотичних факторів. Оскільки досліджувані види є перспективними для біотехнології, їх дослідження також має значення для розробки і вдосконалення методик накопичення та виділення сполук, перспективних для використання, а коротка часний вплив окремих та комбінованих стресових обробок є вдалим методичним прийомом, який широко використовується у біотехнології. Тому дисертаційна робота І.М. Незбрицької є безумовно актуальною і має велике наукове і практичне значення.

Представлені в дисертації результати було одержано в процесі виконання затверджених планів наукових робіт Інституту гідробіології НАН України.

Дисертаційна робота викладена на 162 сторінках і складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, чотирьох розділів експериментальної частини, узагальнення, висновків і списку літератури, в якому налічується 305 джерел, з них 178 англомовних. Результати представлені в тексті на 46 рисунках та в 9 таблицях.

Вступ до дисертації написано компактно і конкретно. В ньому достатньо переконливо обґрунтована актуальність теми, чітко і конкретно визначені мета та завдання роботи, висвітлені найважоміші аспекти наукової новизни та практичного значення отриманих результатів.

Огляд літератури, що займає 20 сторінок тексту дисертації, викладено грамотно і логічно. Огляд розділений на структурні підрозділи, що покращує сприймання і акцентує увагу на основних питаннях, що розглядаються. У підрозділах вдало виокремлено основні захисні системи, які забезпечують активне підтримання клітинного гомеостазу водоростей за умов підвищення температури: 1) структурно-функціональні перебудови фотосинтетичного апарату; 2) температурно-залежні зміни ліпідного складу мембрани; 3) синтез білків теплового шоку; 4) зміни в дихальному метаболізмі; 5) зміни в метаболізмі азоту; 6) активація антиоксидантних систем. Виявляючи глибоке розуміння предмету досліджень, авторка правильно визначає проблеми, які залишаються недостатньо з'ясованими або не дослідженими. Варто наголосити, що дисерантка продемонструвала добре знання літератури в галузі досліджень, в тому числі найновіших праць, які опубліковані в провідних міжнародних наукових журналах.

Основні експерименти проводилися на альгологічно чистих культурах *Chlorophyta*, *Cyanoprokaryota*, які культивувалися за загальноприйнятими методиками, та фітопланктоні затоки Оболонь Канівського водосховища. В Розділі 2 авторка достатньо повно описує умови, процедури проведення експериментів, методику обрахунку результатів і їх інтерпретації. В роботі використано декілька принципово різних, незалежних методичних підходів, що дозволило отримати надійні і обґрунтовані результати. Застосовані методи відповідають сучасному світовому рівню досліджень.

Результати власних експериментів представлені в чотирьох розділах, обсяг яких складає 80 сторінок. В першому, за нумерацією в тексті Розділ 3, проаналізовано результати досліджень впливу різних значень температури на такі інтегральні показники стану метаболізму як інтенсивність росту та вміст фотосинтетичних пігментів у представників *Chlorophyta* та *Cyanoprokaryota*. Максимальну інтенсивність росту і вміст хлорофілу у представників *Chlorophyta* виявлено за температури 20°C, а при підвищенні температури швидкість росту знижувалась і при 38°C спостерігалась зупинка росту і суттєве зниження вмісту хлорофілу *a*. Представники *Cyanoprokaryota* характеризувалися збільшеним вмістом хлорофілу за температур 26°C і 32°C, а найбільшу інтенсивність росту у *Aphanocapsa planctonica* зареєстровано за 32°C. Встановлено, що вміст каротиноїдів і фікобіліпротеїнів найбільший у діапазоні температур культивування 26 – 32°C. Розроблено методичний підхід для отримання максимальної кількості фікобіліпротеїнів, який полягає у комбінуванні зниженого рівня освітленості, підвищення температури та внесення неорганічних джерел нітрогену.

У розділі 4 приведено результати дослідження зміни активності сукцинадегідрогенази та цитохромоксидази – ключових ферментів дихального метаболізму. Використано класичні біохімічні підходи, засновані на спектрофотометричному визначенні продуктів реакцій. Якщо активність

сукцинатдегірогенази практично не змінювалася, то зміни активності цитохромоксидази мали складний характер. Активність ферменту підвищувалася на 14 добу за температур 26°C і 32°C, але на 28 добу культивування, порівняно з 14-ю, знижувалася, що було найбільш виражено у *Tetraedron caudatum*. За температури 32°C на 28 добу активність цитохромокисдази було зареєстровано лише у *Aphanocapsa planctonica*, в інших видів активність за цих умов була відсутня, що свідчить про суттєве пригнічення дихання.

У розділі 5 представлено результати дослідження змін активності ключового ферменту азотного метаболізму – глутаматдегідрогенази (ГДГ). Виявлено суттєві видові відмінності та перебудови метаболізму з часом. За температури 26°C активність обох обох форм ферменту – НАДН- та НАДФН-залежної, зростала, причому у всіх видів, крім *Phormidium autumnale* f. *uncinata* зміни НАДФН- та НАДН-залежної ГДГ активностей мали фазний антибатний характер: активність НАДН-ГДГ підвищувалася на 28 добу порівняно з 14, а НАДФН-ГДГ – знижувалася. За температури 32°C обидві активності пригнічувались, що, очевидно, пов’язано з пригніченням азотного метаболізму.

У розділі 6 представлено результати комплексного дослідження стану прооксидантної та антиоксидантної систем представників *Chlorophyta* та *Cyanoprokaryota* за дії підвищених температур. Досліджено вплив короткочасної теплової обробки на вміст дієнових кон’югатів, гідропероксидів ліпідів та малонового диальдегіду (ТБК-активних продуктів). З усіх досліджуваних видів, лише у *Tetraedron caudatum* спостерігалась суттєва інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів, на що вказує зростання вмісту гідропероксидів ліпідів на 25%. Інші види виявилися відносно стійкими і в них вміст різних продуктів ліпоперосидациї не змінювався або зменшувався. Активність супероксиддисмутази у більшості випадків знижувалася за температури 26°C порівняно з 20°C, а каталази – зростала. За температури 32°C обидва ферменти переважно інгібувалися. Активність глутатіонпероксидази змінювалася симбатно з каталазою у відповідь на зміни температури, що пов’язано з виконанням цими ферментами аналогічної функції – розщеплення пероксиду водню. При температурі 32°C на 28 добу культивування активність пригнічувалася. Результати логічно проаналізовано, зроблено обґрунтоване припущення, що на стаціонарній фазі росту основну роль у захисті від активних форм кисню виконують низькомолекулярні антиоксиданти, оскільки активність ферментної системи антиоксидантного захисту знижується, а кількість низькомолекулярних антиоксидантів зростає на фоні інтенсифікації процесів пероксидного окиснення ліпідів.

В останньому розділі дисертації (Узагальнення) в сконцентрованому вигляді наводяться найважливіші результати, окреслюється їх місце в глобальному контексті досліджень щодо змін метаболізму *Chlorophyta* та *Cyanoprokaryota* за підвищених значень температури.

Отримані дисертантом результати мають важливе наукове і практичне значення. Представлені в дисертації дані розкривають раніше невідомі і не достатньо з'ясовані аспекти функціонування різних захисних систем клітин мікроводоростей на різних фазах росту за умов культивування при підвищених значеннях температури. Розроблений і захищений патентом експериментальний підхід щодо підвищення продукування фікобіліпротеїнів представниками Cyanoprokaryota створює передумови для вдосконалення існуючих методів отримання цих сполук у промислових масштабах з метою використання у медицині. Результати даної дисертаційної роботи формують теоретичний фундамент для розробки таких технологій.

Представлені в дисертації результати є оригінальними, вперше отриманими авторкою завдяки великому обсягу методично складних, проте добре продуманих і спланованих експериментів. Результати коректно математично і статистично опрацьовані. Їх достовірність не викликає сумніву. Зроблені на основі отриманих даних висновки є добре обґрунтованими і відповідають вказаним меті і завданням дослідження.

Загалом робота не має суттєвих недоліків. Водночас слід відзначити деякі оргіхи, головним чином, редакційного характеру:

- 1) На с. 26 у словосполученні «пероксид водню H_2O_2 » смисловий повтор;
- 2) У розділі «Об'єкти та методи досліджень» згадується фероціанатний метод. Ймовірно, йдеться про фероціанідний метод;
- 3) Для ферментативних дослідів використовували ферментну витяжку, проте не описано процедуру її отримання. Процедуру отримання гомогенату водоростей описано в пункті «Активність глутатіонпероксидази», хоча варто було внести в окремий пункт;
- 4) У пункті «загальний вміст ліпідів» згадується процедура «хлороформ-метанолової екстракції». Очевидно, трапилася друкарська помилка і йдеться про хлороформ-метанолову екстракцію;
- 5) У розділі 3 відсутнє пояснення, чому не досліджували ріст *Phormidium autumnale f. incinata*;
- 6) У висновку 3 до розділу 3 вказується, що «За температури вирощування 20 °C порівняно з 26 та 32 °C у культур зелених водоростей та ціанопрокаріот посилюється біосинтез каротиноїдів», хоча з гістограм видно і з тексту можна зрозуміти, що, навпаки, за підвищених температур інтенсифікується біосинтез каротиноїдів.
- 7) Недоречною є заміна слова «каротиноїди» на синонімічну конструкцію «жовті пігменти» в науковому тексті;
- 8) На с. 85 висловлюється недостатньо обґрунтоване та дещо суперечливе припущення про зниження концентрації кисню і спричинену ним інактивацію цитохромоксидази. Для формулювання цього припущення потрібно виміряти фактичну концентрацію кисню за умов культивування. До того ж, якщо цитохромоксидаза

- інактивується, кисень має накопичуватися внаслідок фотосинтетичної активності;
- 9) У тексті зустрічається термін «експоненціальна фаза», а варто було б писати «експоненційна»;
 - 10) На с. 93 вказується, що активність глутаматдегідрогенази зростає, коли «знижується фотосинтез і відповідно зменшується кількість вуглецю», що є некоректним висловлюванням. По-перше, зниження фотосинтезу – це жargonне словосполучення, фотосинтез може, наприклад, пригнічуватися. По-друге, йшлося, очевидно, про дефіцит вуглеводів, а не зменшення кількості вуглецю;
 - 11) На с. 114 згадується «реакційна здатність ферменту» щодо каталази, що є некоректним у даному випадку, оскільки досліджували активність ферментної витяжки, яка корелює в першу чергу з кількістю активного фермента, а не його реакційною здатністю;
 - 12) У деяких висновках не дуже вдало побудовані речення, зустрічається смислова тавтологія, наприклад, у висновку 1 написано «Виявлено, що... інтенсивність... спостерігалась», у висновку 7 – «встановлено, що... зміни... виявилися»;
 - 13) Висновки зроблено у минулому часі, що може сприйматися як одиничні результати, які не можна узагальнювати на теперішній і майбутній час. Краще було б писати «спостерігається», «є», «зростає» і т. д.;
 - 14) У висновку 9 некоректно зазначається, що активності каталази та супероксиддисмутази знаходилися у протифазі, оскільки термін «протифаза» стосується пари гармонічних хвиль, зсув фази між якими становить рівно 180° . В роботі немає математичних підстав стверджувати що зміни активностей досліджуваних ферментів описуються рівнянням гармонічних коливань і, відповідно, що вони знаходяться у протифазі. Можна лише стверджувати, що у межах даного дослідження ці дві активності змінювалися антибатно, тобто у протилежних напрямках.

Зроблені зауваження не є суттєвими та не знижують загальної високої позитивної оцінки дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота І.М. Незбрицької є самостійним оригінальним дослідженням, виконаним на високому методичному та науковому рівні. Вона є завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, що суттєво розширяють і поглинюють уявлення про механізми пристосування метаболізму водоростей до підвищених температур та зміни вмісту фотосинтетичних пігментів, зокрема фікобіліпротеїнів, за стресових умов, що відкриває нові можливості для біотехнології. Авторка проявила себе вдумливим експериментатором та інтерпретатором результатів. Опубліковані за

матеріалами дисертації праці та автореферат повністю відображають основні положення дисертації та відповідають їй за змістом.

З огляду на викладене, дисertaційна робота І.М. Незбрицької «Особливості функціонування представників Chlorophytū та Cyanoprokaryota за умов підвищення температури водного середовища» відповідає вимогам п.13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів 24 липня 2013 року №567 (із змінами, внесеними згідно з постановами КМ № 656 від 19.08.2015 та № 1159 від 30.12. 2015 р.), а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.17 – гідробіологія.

Офіційний опонент,
кандидат біологічних наук,
докторант відділу
мембранології і фітохімії
Інституту ботаніки
ім. М.Г. Холодного НАН України

 Поліщук О.В.

27.03.2017

вул. Метрологічна, 1, кв. 44,
+380685928614
polishch@yandex.ru

