

ВІДГУК

офіційного опонента

доктора біологічних наук, професора Мартинюка Віктора Семеновича
на дисертаційну роботу **Безкоровайного Андрія Олеговича**
«Ліпідний профіль, вільнорадикальні та транспортні процеси зародків
в'юна за впливу похідних 1,4-нафтохінону»,
подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність теми дисертаційного дослідження.

Дисертаційна робота *Безкоровайного Андрія Олеговича* присвячена вивченню впливу новосинтезованих амідних похідних 1,4-нафтохінону на внутрішньоклітинні та мембранопов'язані процеси у зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L.

Безперечно **актуальною** у контексті зазначеної проблематики є тема дисертаційної роботи *Безкоровайного А.О.*, яка передбачає з'ясування механізмів впливу новосинтезованих амідних похідних 1,4-нафтохінону на клітинному рівні. Добре відомо, що хінонові сполуки проявляють високу фізіологічну активність різного типу. Сполуки на основі 1,4-нафтохінону широко застосовуються у медичній та ветеринарній практиці як бактеріостатичні, бактерицидні і фунгіцидні препарати. Традиційно хіноїдні сполуки відносять до другого великого класу протипухлинних засобів, представники якого перебувають на різних стадіях доклінічних та клінічних досліджень. Проте застосування багатьох 1,4-нафтохінонів часто обмежується їхньою надмірною токсичністю, а механізми такої дії не завжди досконало вивчені, особливо вплив цих сполук на процеси ембріогенезу. Тому автором дисертації вдало використано зручну експериментальну модель ембріональної клітини, на прикладі зародка костистої риби в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). При цьому головна увага зосереджена на впливі хінонових сполук на ліпідний профіль зародків та важливих регуляторних систем, що беруть участь у підтримці гомеостазу внутрішнього середовища організму, адаптації до дії екзогенних чинників та регуляції біофізичних і метаболічних процесів в клітинах.

Робота *Безкоровайного А.О.* цілком і повністю виконана в межах тематики НДР кафедри біофізики та біоінформатики Львівського

національного університету імені Івана Франка як складова частина таких науково-дослідних тем: «Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та системи мембранного транспорту біооб'єктів за дії фізико-хімічних чинників» № реєстрації 0116U001633 (2016–2018 рр.), «Стан іонтранспортних та антиоксидантної систем біооб'єктів за дії фізико-хімічних чинників», № реєстрації 0113U000866 (2013–2015 рр.). Період виконання відповідних кафедральних тем повністю збігається з часом виконання рецензованої дисертаційної роботи.

Мета роботи є чітко сформульованою. Для вирішення мети поставлені адекватні завдання дослідження, на які автор дисертації у подальшому надає відповіді, що ґрунтуються на експериментальних даних.

Наукова новизна роботи полягає у вивченні та з'ясуванні особливостей впливу похідних 1,4-нафтохінону на морфо-функціональні параметри розвитку зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. Так, вперше досліджено ліпідний профіль зародків в'юна на окремих стадіях раннього ембріогенезу за дії хінонових похідних. Встановлено, що за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, 2-хлоро-3-(3-оксо-3-(піперидин-1-іл)пропіламіно)-1,4-нафтохінону (ФО-1) та 2-хлоро-3-(3-(морфолін-4-іл)-3-оксопропіламіно)-1,4-нафтохінону (ФО-2) на зародки в'юна протягом раннього ембріогенезу ліпідний склад зазнає змін. Хінонові похідні суттєво діють на фосфоліпідну фракцію зародків.

Вперше було проведено дослідження впливу амідних похідних 1,4-нафтохінону на ранній розвиток зародків та встановлено, що відбувається порушення інтенсивності вільнорадикальних реакцій, яке підтверджується зміною вмісту продуктів ліпопероксидації, розбалансуванням активності ферментів системи антиоксидантного захисту клітин та пригніченням активності іон-транспортуючих ферментів (Na^+ , K^+ -АТФази та сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної АТФазної активності). Показана кореляція між внутрішньомолекулярними та мембранопов'язаними змінами та порушеннями ультраструктури клітин зародків в'юна. Доведено, що такі кореляції є надійним показником особливостей дії різних екзогенних чинників на ембріональні клітини.

Ступінь обґрунтованості й достовірності наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Представлені експериментальні результати, отримані вперше дисертантом (розділи 3 і 4), логічно пов'язані з метою і поставленими завданнями. Наукові положення, які виносяться на захист, та сформульовані

висновки належно обґрунтовані та підтверджені експериментально і відображають статистично достовірні зміни, що викликані дією речовин хіноїдної природи.

Теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи. Дисертаційна робота *Безкоровайного А.О.* є закінченою, самостійною науковою працею, в якій отримано низку нових даних, важливих як у теоретичному, так і у практичному аспекті. Результати роботи є достовірними.

З наукової точки зору, отримані результати та їхній аналіз поглиблюють сучасні уявлення про механізми впливу похідних 1,4-нафтохінону на іонтранспортувальні системи мембран, прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та життєдіяльність зародків і личинок в цілому. Експериментальні дані та теоретичні узагальнення дисертаційної роботи планується впровадити у навчальний процес при викладанні загального курсу «Біофізика» та спецкурсів: «Біофізика мембран», «Біофізика клітини» на біологічному факультеті Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача є достатнім, він наведений при цитуванні статей та тез, опублікованих за темою дисертаційної роботи.

Повнота викладу в публікаціях наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Відповідно до чинних вимог щодо опублікування результатів дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук за темою дисертаційної роботи здобувачем опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах (один з яких входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus). Викладені у дисертації положення також пройшли необхідну апробацію, що засвідчують 9 тез доповідей у матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій.

Опубліковані результати дослідження Безкоровайного А.О. цілком відображають зміст та основні положення його дисертаційної роботи.

Достовірність і новизна наукових положень.

Результати досліджень викладені у дисертаційній роботі з належною повнотою, проілюстровані великою кількістю графіків, електронно-мікроскопічних фотографій та таблицею. Отримані дані є статистично опрацьованими, а їхня достовірність не викликає сумніву.

Дисертант застосував сучасні методи біометричного аналізу експериментальних даних, серед яких дисперсійний та кореляційний.

Структура дисертаційної роботи узгоджена з вимогами наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 і містить такі елементи: анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень, обговорення, висновків, списку використаних джерел (217 найменувань), а також трьох додатків. Роботу викладено на 186 сторінках (з них основного тексту 132 сторінки), ілюстровано 53 рисунками та 13 таблицями. У вступі обґрунтована тема дисертаційної роботи.

Розділ 1 «Огляд літератури», викладений на сторінках 21–41, за обсягом і змістом є достатнім для повного розкриття наукової проблеми, що потребує подальшого вивчення. Розділ побудований на аналізі 217 джерел. Значна кількість використаних дисертантом джерел літератури є новими.

Загалом, виклад матеріалу в розділі «Огляд літератури» є логічним. У ньому дисертантом висвітлені та проаналізовані сучасні уявлення щодо основних властивостей 1,4-нафтохінона та його похідних, їхнього впливу на механізми регуляції клітинного гомеостазу. Охарактеризовано активність похідних 1,4-нафтохінону залежно від особливостей їхньої структури та включення замісників.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» викладено на сторінках 42–55. Об'єктом досліджень були зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L. У дисертаційній роботі коректно застосовуються сучасні біофізичні методи: хромато-мас-спектрометричний та спектрофотометричний методи, комп'ютерний біологічний скринінг, біометричні методи: дисперсійний та кореляційний аналізи, методи світлової та електронної мікроскопії, які дозволили автору виконати поставлені завдання і досягнути кінцевої мети. В цілому, опис методів роботи дає змогу за необхідності відтворити умови експерименту і дозволяє зробити висновок про адекватність обраних методів поставленим завданням.

Розділ 3 «Результати досліджень» викладено на сторінках 56–126, що становить більшу частину в структурі дисертаційної роботи Безкоровайного А.О. «Результати досліджень» логічно поділені на 9 підрозділів, деякі з них, в свою чергу, є також розділеними. Інтерпретація ряду даних проводилася за участю наукового керівника і співавторів публікацій. Результати досліджень викладені з належною повнотою і детальністю, з наведенням статистичних достовірностей отриманих даних і наведені в окремому розділі.

У першому підрозділі (підрозділ 3.1) проведено прогноз біологічної активності похідних 1,4-нафтохінону за допомогою комп'ютерного скринінгу. У наступному підрозділі виконано дослідження на виживання зародків

на перших етапах раннього розвитку за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та амідних похідних ФО-1, ФО-2. Вивчені морфологічні зміни зародків та личинок.

У наступних підрозділах (підрозділи 3.3–3.4) досліджено, що за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та похідних ФО-1 та ФО-2 зменшується вміст основних ліпідних компонентів, що може впливати на активність мембранних білків та призводити в подальшому до загибелі зародків. Помічено зменшення вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивних продуктів). Враховуючи порушення вільнорадикальних реакцій, у наступному підрозділі (підрозділ 3.5) досліджено функціональний стан антиоксидантної системи захисту організмів, оснований на вивченні активності її ферментативної (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза) складової.

У підрозділах 3.6, 3.7 вивчено інгібування активності Mg^{2+} -залежних Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} -АТФаз мембран зародків в'юна на різних етапах раннього ембріогенезу цього організму за дії хінонових похідних.

За допомогою електронної мікроскопії вивчено зміни ультраструктури бластомерів зародків в'юна за дії хінонових похідних (10^{-5} М та 10^{-7} М) на початку (стадія 2 бластомерів) і на завершенні синхронних поділів бластомерів (стадія 1024 бластомерів). Електронно-мікроскопічні фотографії свідчать, що під дією досліджуваних сполук суттєво змінюються органели зародків: пошкоджуються мембрани мітохондрій, набряк та гіпертрофія каналів гранулярного та агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, утворення везикул та збільшення кількості пероксисом. Такі зміни в ультраструктурі бластомерів зародків обумовлюють порушення метаболічних процесів і, в кінцевому результаті, можуть призвести до загибелі зародків.

В останньому підрозділі «Результати досліджень» (підрозділ 3.9) відображений двофакторний дисперсійний аналіз впливу часу розвитку та 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2 на вміст ТБК-позитивних продуктів, активності ферментів антиоксидантної системи, Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз впродовж ембріогенезу зародків в'юна.

Розділ 4 «Обговорення результатів» викладений на сторінках 127–146. Дисертант провів ґрунтовний аналіз отриманих даних, порівнявши деякі з них з результатами подібних досліджень наукової літератури. Обговорення власних результатів *Безкорвайного Андрія Олеговича* науково обґрунтоване.

Важливою у розділі «Обговорення результатів» є гіпотетична схема

щодо впливу досліджуваних сполук, в якій наведено молекулярні механізми дії похідних 1,4-нафтохінону на клітини зародків в'юна. Хоча деякі аспекти цих механізмів вимагають додаткових експериментальних доказів, значення такого аналізу від цього не зменшується.

За результатами дисертаційної роботи *Безкоровайного А.О.* зроблено 6 висновків. Усі висновки є чітко структурованими, логічними, належно обґрунтованими та узагальнюючими, і тому можуть стати основою для проведення подальших досліджень у галузі біофізики щодо процесів раннього розвитку. Висновки базуються на статистично оцінених результатах роботи.

Попри позитивну оцінку, на яку заслуговує дисертаційна робота *Безкоровайного А.О.* в цілому, дисертантові варто звернути увагу на окремі недоліки, які можуть стати підґрунтям для дискусії, зокрема на такі **зауваження та побажання щодо змісту та оформлення дисертаційної роботи:**

1. Автором дисертації значна увага приділяється біохімічним механізмам дії нафтохінонів. Але ефекти, які спостерігає здобувач на моделі зародкових клітин, певною мірою можуть бути викликані і генотоксичною дією вказаних речовин. Про це дуже мало сказано в дисертації, але було б цікаво почути думку автора щодо можливих біофізичних механізмів генотоксичної дії нафтохінонів.
2. Враховуючи той факт, що дисертація захищається за спеціальністю «біофізика», доцільно було б викласти міркування її автора про те, яким чином зміни ліпідного спектру, що спостерігаються в експериментах, можуть вплинути на біофізичні характеристики біологічних мембран, і як такі зміни можуть пояснювати виявлені в роботі зміни активності мембранних транспортних систем клітин.
3. Для пояснення механізмів дії нафтохінонів автор дисертації використовує ідею про їхній вплив на про-анти-оксидантний баланс в клітинах, посилаючись на важливу роль тіолових сполук. Але, на жаль, у роботі не наведено жодного показника, що міг би свідчити про концентрацію білкових і небілкових тіолових груп.

Загалом вище зазначені зауваження та побажання не впливають на позитивну оцінку роботи, оскільки вона виконана на належному науковому і методичному рівні.

Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота **Безкоровайного Андрія Олеговича** на тему «**Ліпідний профіль, вільнорадикальні та транспортні процеси зародків в'юна за впливу похідних 1,4-нафтохінону**» має завершений характер і відповідає чинним вимогам до кандидатських дисертацій.

Дисертаційна робота оформлена згідно з вимогами – представлені всі необхідні розділи: вступ, анотація, огляд літератури, опис методів дослідження, викладення власних результатів та їх обговорення, висновки, список використаних джерел. Загальний обсяг роботи складає 186 сторінок (з них основного тексту 132 сторінки).

Експериментальні дані проаналізовані і статистично опрацьовані з використанням комп'ютерної техніки. Наукові положення, висновки та рекомендації обґрунтовані і логічно випливають з отриманих результатів.

Зміст автореферату відображає основні положення дисертаційної роботи.

Висновок. Дисертаційна робота **Безкоровайного Андрія Олеговича** на тему «**Ліпідний профіль, вільнорадикальні та транспортні процеси зародків в'юна за впливу похідних 1,4-нафтохінону**» є самостійним, цілісним і завершеним науковим дослідженням, відповідає вимогам пп. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами та доповненнями), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент –
доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри біофізики та медичної інформатики,
проректор з наукової роботи

Київського національного університету
імені Тараса Шевченка



В.С. Мартинюк