

РЕЦЕНЗІЯ

кандидата біологічних наук, доцента

ВОЛОЩУК ОКСАНИ МИКОЛАЇВНИ

на дисертаційну роботу

КАРАВАНА ВОЛОДИМИРА ВАСИЛЬОВИЧА

на тему: “Вплив дієти на біомаркери стресу у *APIS MELLIFERA*”,

подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії PhD

091 Біологія

1. Актуальність теми дисертації.

Бджільництво належить до пріоритетних галузей сільського господарства і є важливим для формування продовольчої безпеки країни, оскільки забезпечує не лише потреби населення у цінних харчових продуктах, але і відіграє важливу роль у збереженні біорізноманіття та підвищенні врожайності ентомофільних культур. Визначальним для виживаності бджоли медоносною вважається характер підгодівлі, оскільки додаткова підгодівля стимулює ріст та розвиток цих комах, підвищує стійкість до несприятливих чинників зовнішнього середовища, а також продуктивність бджолосімей, особливо у період весняного розвитку чи у період між цвітінням. Окрім того, важливим для виживаності бджіл є температурний режим зимівлі. Зміна раціону харчування, як і зміна температурного режиму, може супроводжуватися формуванням стану окисного стресу, водночас біохімічні механізми адаптації бджіл до цих чинників залишаються не вивченими. Розуміння цих механізмів дозволить науково обґрунтувати та розробити практичні рекомендації для пасічників, що дозволить знизити смертність бджіл.

Враховуючи вищесказане, дисертаційне дослідження Каравана В.В., в центрі уваги якого знаходиться встановлення взаємозв'язку між виживаністю/смертністю бджоли медоносною та особливостями накопичення продуктів вільнорадикального ушкодження ліпідів, протеїнів, а також активностями антиоксидантних ензимів, за умов споживання різних дієт та впливу низько- та високотемпературних режимів, є актуальним.

Для досягнення поставленої мети здобувач окреслив конкретні завдання, вирішення яких дозволило отримати результати, що мають практичне значення.

2. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність і новизна, повнота їх викладу в опублікованих працях.

Отримані результати, сформульовані наукові положення та висновки базуються на достатній кількості експериментального матеріалу, впливають з поставлених завдань дослідження. Експериментальні групи сформовані коректно, дослідження у польових і лабораторних умовах проведені у достатній повторності, що дозволяє проводити статистичний аналіз. Методичні підходи, застосовані для моделювання різних температурних режимів та підходів до підгодівлі бджіл, є загалом коректними та обґрунтованими. Вперше показано, що споживання пилку верби, або перги верби і ріпаку зменшує смертність бджіл, а також, що найменша смертність бджіл при температурі 14 та 28 °C спостерігається при споживанні бджолами фруктози, тоді як глюкозовмісна дієта індукує зниження виживаності бджіл за температури 28 °C.

Результати дисертаційного дослідження детально проаналізовані та підтверджені достатньою кількістю ілюстрацій (20 рисунків, 3 таблиці). Висновки у дисертаційній роботі впливають із результатів дослідження.

Результати дисертаційної роботи висвітлені у 15 публікаціях, з них 1 стаття у міжнародному виданні, що входить до науково-метричної бази Scopus та належить до першого квартиля відповідно до класифікації SCImagoJournal & CountryRank, 4 статті у фахових виданнях України. Наукові публікації не є тотожними за змістом. Отримані під час проведення дисертаційного дослідження результати оприлюднені на 11 конференціях. Здобувач є співавтором трьох патентів на корисну модель.

Відповідно до даних програми UNICHECK, дисертаційна робота за результатами перевірки вважається такою, що має високий рівень оригінальності (4,65 % схожості).

3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Аналіз результатів свідчить, що досліджені параметри оксидативного стресу та активностей антиоксидантних ензимів демонструють тагмоспецифічність. Проведення кореляційного аналізу дозволило встановити окремі параметри, між якими існує позитивна кореляція, за умов утримання бджіл за температури 28 °С. Водночас показано, що за умов утримання тварин за температури 14 °С жодний досліджуваний біохімічний параметр не показує тісної кореляції із виживаністю бджіл. Отримані результати розширюють існуючі уявлення про вплив вуглеводної підгодівлі та різних температур утримання на показники оксидативного стресу у бджоли медоносної.

Робота має практичне значення, оскільки частина отриманих результатів впроваджена у селекційну роботу ГО “Асоціація виробників продуктів бджільництва “Буковинський бджоляр””.

4. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Загальний обсяг роботи складає 133 сторінки машинописного тексту. Основна частина роботи викладена на 98 сторінках. Список використаних джерел нараховує 202 роботи, з них 195 – латиницею.

Структура дисертації відповідає загальноприйнятим вимогам і складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, методів дослідження та чотирьох розділів результатів, висновків, списку використаних джерел, а також додатку.

В **Анотації**, поданій українською і англійською мовами, стисло наведені основні положення дисертаційної роботи.

У **Вступі** відображена актуальність обраної теми; її зв'язок з науковими темами; мета та завдання дослідження; об'єкт, предмет та методи дослідження; вказана наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача.

У **розділі I** наведений аналітичний огляд сучасних наукових джерел літератури, який викладений на 23 сторінках, і складається з семи підрозділів, у яких проаналізовані існуючі на сьогодні уявлення про оксидативний стрес,

мішені дії активних форм кисню та антиоксидантні ферменти; вплив різних температурних режимів на організм бджіл, особливості їх харчування та існуючі на сьогодні уявлення про вплив харчування на маркери оксидативного стресу та виживаність бджіл за дії стресових чинників.

Огляд написаний логічно і підводить до сформульованих дисертантом мети та завдань дослідження. Структурованість викладу свідчить про обізнаність здобувача з результатами наукових досліджень інших вчених. У цьому розділі дисертант робить акцент на положеннях, що потребують подальшого дослідження.

У **розділі II** Матеріали та методи досліджень, який викладений на 9 сторінках, описані використані методичні підходи та дизайн експерименту. Увага акцентована на описі умов утримання бджіл у польових та лабораторних умовах; методах визначення продуктів оксидативного ушкодження ліпідів, протеїнів та активностей антиоксидантних ензимів.

У **розділі III** Результати та їх обговорення, викладеному на 58 сторінках, наведені результати експериментального визначення активності антиоксидантних ензимів, показників інтенсивності вільнорадикального ушкодження ліпідів та протеїнів у різних тагмах бджіл; виживаності/смертності бджіл за умов впливу різних дієт і різних температур утримання та проаналізований взаємозв'язок між дослідженими параметрами.

Результати проілюстровані 20 рисунками і 3 таблицями.

Проведені дослідження дозволили встановити вплив різних дієт та різних температур утримання на виживаність/смертність бджоли медоносної та продемонстрували можливість підвищення виживаності робочих бджіл шляхом штучної підгодівлі певними дієтами.

5. Запитання та зауваження щодо оформлення та змісту дисертації.

Варто звернути увагу на недоліки, які є в роботі:

- назва роботи не коректна, оскільки з назви не зрозуміло, про який стрес іде мова (температурний чи оксидативний стрес); у меті роботи не відображено,

що в роботі буде оцінена виживаність/смертність бджіл за умов різних температур утримання;

• зустрічаються не коректні формулювання, наприклад:

- на с. 3 дисертант вказує, що “вміст ТБК-активних продуктів, тіолових груп та карбонільних похідних білків” є біохімічними показниками, які відображають стан неферментативної ланки захисту організму. Таке формулювання є не коректним;

- пункт 3.4.3. називається “Вплив вуглеводних дієт на продукцію АФК...”, проте у цьому розділі, як і у роботі загалом, визначення продукування АФК не проводилося;

• у роботі зустрічаються численні невідповідності між підписами/цифровими значеннями, наведеними на рисунках, і відповідним описом у тексті, наприклад:

- на рис. 2.1.1 вказано, що вологість у однорамочному ізоляторі складала 80 %, тоді як у тексті описано, що вологість складала 70 %;

- цифрові значення активності САТ, описані у тексті (с. 53), не збігаються з цифровими значеннями, відображеними на рис. 3.1.1.;

- узагальнення на с. 55, що “підгодівля... 30 % цукровим сиропом сприяла зростанню активності САТ” не відповідає результатам, наведеним на рис. 3.1.1.;

- на с. 59 зазначено, що “в черевці найнижчі значення активності GST виявлено в групі, що не отримувала додаткової підгодівлі”, що не відповідає отриманим результатам, оскільки на рис. 3.1.2. показано, що достовірної різниці між бджолами, які отримували підгодівлю фруктозою чи глюкозою порівняно з комахами без додаткової підгодівлі, немає (позначено літерою b);

- на с. 63 вказано, що “за температури 14 °С у тканинах черевця вміст ТБКАП зазнавав деякого зростання у бджіл четвертого відбору, але в подальшому знижувався до попереднього рівня”, що не відповідає результатам, наведеним на рис.3.2.1.;

- на с. 69 вказано, що “активність GST була вищою за температури +5 °C, ніж за +14 °C ... у черевці наприкінці експерименту”, що не відповідає результатам, наведеним на рис.3.2.3.;

- на с. 71 вказано, що найнижчою на 16-й день була виживаність бджіл, які споживали 50% розчин сахарози, проте на рис. 3.3.2 відображено, що найнижча виживаність була у комах, які споживали розчин сахарози + амінокислоти;

- на с. 77 вказано, що “споживання пилку ріпаку спричиняло більше зростання цього біомаркера (рівня карбонілювання), ніж пилки верби”, що не відповідає результатам, наведеним на рис.3.2.4.;

- на с. 90 вказано, що “при температурі 28 °C різниця у вмісті карбонільних похідних в тканинах грудей за підгодівлі різними дієтами виявилась статистично невірогідною”, що не відповідає результатам, наведеним на рис.3.4.4. (A).

•дисертант наводить некоректні пояснення/узагальнення, які не випливають з результатів власних досліджень, зокрема:

- автор вказує, що “...глюкоза і фруктоза окремо мають відмінний вплив на метаболічні процеси у бджоли...” (с. 56), проте визначення активності лише одного ензиму – каталази – не дозволяє робити узагальнення про метаболічні процеси загалом;

- автор пояснює підсилення процесів ПОЛ зростанням продукції АФК (с. 64), проте продукція АФК у роботі не вивчалася; аналогічно на с. 67 вказано, що “наші дані свідчать, що підсилена генерація АФК ... викликає зростання активності САТ”, що свідчить про маніпулятивний характер пояснень; відповідно пояснення на с. 94 “високу концентрацію SH-груп у голові за підгодівлі глюкозою можна пояснити зниженням генерації АФК при використанні цієї дієти” є некоректним;

- на с. 79 дисертант розглядає підвищення активності САТ у голові бджіл як захисну реакцію “на споживання дієт, що містять перекис водню”. Таке пояснення є не коректним, оскільки наявність/вміст пероксиду водню у складі дієти дисертант не визначав;

- на с. 53 дисертант пояснює, що “висока каталазна активність у черевці може бути пов’язана з життєдіяльністю мікрофлори кишечника”, що є не коректним, оскільки на с. 48, у розділі Дослідження у лабораторних умовах, автор вказує, що у бджіл витягували кишечник перед відбором частин тіла;

- зауваження щодо оформлення рисунків:

- на рис. 3.3.1 на осі ординат не вказано, за який час споживала 1 бджола вказаний об’єм розчину (у мкл);

- на рис. 3.4.1., рис. 3.4.2. відсутні позначення достовірності показників;

- на рис. 3.4.2. (А) позначено криві виживання бджіл протягом 1-10 дня експерименту, на рис. 3.4.2. (В) – цей показник на 6-10 день експерименту. Фактично рис. В є частиною рис. А, проте цифрові значення, наведені на рис. А, не збігаються з цифровими значеннями, наведеними на рис. В.

- коректно було б визначати показники окисного стресу у окремих органелах, виділених із тагм бджіл, а не у гомогенаті;

- на с. 48 не вказано, як розраховували вміст ТБКАП після того, як визначили оптичну густина при довжині хвилі 532 та 600 нм;

- у висновку 7 вказано, що “за допомогою зміни раціону харчування можна пом’якшити дію стресових факторів на робочих бджіл”, проте не вказано, які ж раціони можуть бути рекомендовані пасічникам для підгодівлі бджіл з метою підвищення їх виживаності;

- у роботі зустрічаються численні граматичні та стилістичні помилки, деякі речення дублюються або не мають закінчення (с. 22, 26, 29, 30, 34-35, 42, 50, 61, 74, 85, 86, 87, 90, 105, 106 тощо), зустрічаються некоректні висловлювання: “окиснених модифікацій” (с. 27), “субодиниця має глибоко вбудовану систему гему” (с. 29), “комахи не мають активності GRX” (с. 31), “дієтичне співвідношення макроелементів” (с. 42); не коректно наведені скорочені позначення супероксиду (с. 26, 34).

Крім зауважень, до автора є запитання:

1. Дисертантом показано, що “збільшення виживаності робочих бджіл за споживання певних дієт може бути пов’язано із зростанням перекісного окислення ліпідів та карбонілювання білків” (с. 4). Також у роботі показано, що найвищу виживаність мали бджоли, у яких рівень ТБКАП був найвищим. Як можна пояснити такий контрверсійний факт?

2. При проведенні експерименту у польових умовах бджіл два тижні підгодовували 30% розчином сахарози, після чого протягом 4-х діб бджоли споживали різні дієти, після чого бджіл знову переводили на початкову дієту (с. 44). У той же час у експерименті 1 на певному раціоні бджіл утримували протягом 17 діб (с. 45). Чим зумовлений вибір тривалості підгодовлі бджіл різними дієтами і чи достатньо 4 діб споживання таких дієт, щоб індукувати зміни активностей вільнорадикальних процесів?

3. У дослідженні впливу підгодовлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот використовували бджоли з пасіки Університету природничих наук у м. Люблін, тоді як у інших дослідженнях використовували бджоли місцевої популяції (гібриди карпатської, української степової та кавказької порід). Чи не можуть встановлені показники оксидативного стресу чи активності каталази у комах, різних за походженням, бути зумовлені їх генетичною різноманітністю?

4. Чому з метою адаптації бджіл до умов досліду у різних експериментах комах годували різними розчинами: у польових умовах – 30% розчином сахарози, у експерименті 1 – 50 % розчином сахарози, у експерименті 2 – 25% розчином глюкози + 25 % розчин фруктози?

5. На с. 49 (розділ Матеріали і методи) вказано, що у роботі визначали вміст загальних тіолів, проте на с. 93 (розділ Результати та їх обговорення) вказано, що у роботі досліджували вміст низькомолекулярних тіолів (пункт 3.4.3.3 Вміст низькомолекулярних тіолів за різних вуглеводних підгодовель). Оскільки методичні підходи до визначення вмісту загальних та низькомолекулярних тіолів відрізняються, то потребує уточнення питання, то що ж все-таки визначав дисертант?

6. Як можна пояснити, що припинення підгодівлі викликало зменшення активності САТ у черевці, тоді як у грудях і голові цей показник не змінювався (рис. 3.1.1)?

7. На с. 59 вказано, що “різниця в активності GST...може бути зумовлена різницею в експресії відповідних генів”. Таке пояснення є спекулятивним, оскільки у роботі експресія цих генів не вивчалася. Поясніть, який існує зв’язок між харчуванням і експресією генів, що кодують цей ензим?

8. На рис. 3.4.1. вказано, що бджоли, які споживали 50 % розчин сахарози, у середньому споживають понад 100 мкл/особину, тоді як на рисунку 3.3.1. тварини контрольної групи, які також отримували 50% розчин сахарози, у середньому споживали 40-50 мкл/особину. Як можна пояснити таку різницю в об’ємі спожитого корму між особинами при проведенні різних експериментів?

9. Який можливий механізм посиленого утворення ТБКАП у голові бджіл за умов споживання перги ріпаку порівняно з бджолами, які споживали пергу верби, та відсутності достовірних змін цього показника у черевці цих бджіл?

10. Дисертант розглядає накопичення біомаркерів окиснювального пошкодження як прямий наслідок споживання прооксидантів з їжею (с. 81), висновок 4 (с. 111). Про які прооксиданти іде мова, якщо їх склад та вміст у дієтах не визначався?

11. Як пояснити, що споживання пилку верби не впливало на вміст ТБКАП у голові і черевці робочих бджіл, проте індукувало підвищення вмісту карбонільних похідних у черевці?

12. На с. 99 вказано, що “складається враження, що виживаність бджіл за підгодівлі різними вуглеводними дієтами корелює із активністю SOD у черевці”. Чи підтверджено таке припущення результатами кореляційного аналізу і чи корелює виживаність із активністю SOD у інших тагмах?

13. У пункті 3.4.4.2. дисертант вказує, що “найвища активність САТ у голові виявлена при використанні дієт, за яких спостерігається найвища смертність робочих бджіл”. Який зв’язок між активністю САТ і смертністю робочих бджіл?

6. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертація Каравана Володимира Васильовича «Вплив дієти на біомаркери стресу у APIS MELLIFERA», яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії PhD (091 Біологія), є самостійною закінченою науковою працею, що має практичне значення та відповідає вимогам пунктів 6, 7, 8, 9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 (із змінами внесеними згідно з Постановою Кабінету Міністрів України від 21 березня 2022 р. № 341 та від 19 травня 2023 р. № 502).

Дисертант з урахуванням виконання у повному обсязі освітньої складової освітньо-наукової програми та індивідуального плану наукової роботи, заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Кандидат біологічних наук, доцент
кафедри біохімії та біотехнології
навчально-наукового інституту
біології, хімії та біоресурсів
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

Оксана ВОЛОЦУК

Підпис: *Волощук О.* засвідчує
Учений секретар Чернівецького національного
університету імені Юрія Федьковича
Дієвська Н. С.
" 04 " травня 2024

