

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію САЛИГИ ЮріяТарасовича
«ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ХЛОРПІРИФОСУ ТА
КАРБОФУРАНУ НА ОРГАНІЗМ ТВАРИН», подану на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Дослідження молекулярних механізмів впливу фосфоорганічних та карбаматних засобів захисту рослин на нетаргетні організми набуває зростаючого значення у зв'язку із інтенсивним використанням хімічних засобів захисту рослин, а отже посиленням ризику їх потрапляння у продукцію, особливо, вирощену по-за межами Європейського Союзу, де нещодавно введені істотні обмеження. Проте, їх застосування у низці країн включно із США та у ЄС для знищення широкого спектра шкідливих комах домашніх тварин і кліщів залишається актуальним. В Україні ринок інсектицидних препаратів випереджує світові тенденції. Очікувано, реальну загрозу тривалого впливу агрохімікати становлять у першу чергу для жінок, які несуть основний тягар серед 12 млн сільських робітників в Україні - («women bear the brunt with pesticides». В Україні у 2014 р смертність населення у сільській місцевості була значно вища, ніж у міських поселеннях, а якщо проаналізувати її причини, то слід визнати, що хвороби системи кровообігу, новоутворення та зовнішні причини смерті (у тому числі отруєння, розлади психіки та поведінки) є наслідком не лише соціально вагомих чинників, але й тривалого використання агрохімікатів. Дослідження у Іспанії довели, що суїциди трапляються найчастіше у місцевостях, де застосовують фосфоорганічні пестициди (*Parron et al., 1996*).

Як відомо, більшість застосованих пестицидів – це органофосфатами та карбаматами, які за своєю дією на таргетні організми проявляють нейротоксичний ефект, блокуючи холінестеразу у центральній і периферійних нервових тканинах. Серед таких чинників дисертант обрав найбільш поширені – хлорпірифос (ХПФ) та карбофуран. Проте інші молекулярні реакції крім пригнічення холінестеразної активності, для хлорпірифосу та карбофурану практично не досліджені. При аналізі дії пестицидів повинна бути чітко окреслена межа між впливом на таргетні організми, що відповідає гострій токсичності, та на нетаргетні організми, які можуть зазнавати як гострого, так і тривалого впливу у субтоксичних концентраціях, що призводить до акумуляції та трансформації у організмі. На відміну від гостротоксичного ефекту, останній шлях дії був влучно охарактеризований як «Тихий вбивця» (Ю. Салига, VOXUKRAINE.ORG/2015/12/01). Зокрема, одним із найбільш загрозливих аспектів токсичності карбофурану у вагітних жінок зумовлений здатністю його та його двох головних метаболітів (3-гідроксикарбофурану та 3-кетокрбофурану) долати плацентарний бар'єр (*Gupta et al., 1994*). Важливо, що навіть через 50 р з початку вживання органофосфатів, терапія отруєння цими речовинами малоуспішна, а фатальні випадки складають більше, ніж 15 % (*Eddleston et al., 2008*). Хоча оцінка холестеразної активності залишається ключовим чинником діагностики, рання терапія пов'язана із кисневим забезпеченням тканин. З іншого боку, окисні перетворення є ранніми стадіями метаболізму ХПФ з утворенням більш токсичних продуктів. Слід відзначити, що поряд із оцінкою протеому, глікому та ліпідому, з'ясування кількісних співвідношень вмісту широкого спектру металів – металому (*metallome*) в організмі набуває дедалі більшого поширення за вивчення впливу несприятливих чинників (*Gagné et al., 2013*). Перспективним вважається корекція стану металів у організмі за впливу нейротоксикантів, зокрема введення сульфату магнію, але його дія малодосліджена. Для фенілкарбаматів, з яких одним з найбільш токсичних є карбофуран, також вирішальною стадією метаболізму є розклад під впливом гідроксирадикалів, у реакції Фентона за участю іонів Феруму (*Jaiswal et al., 2013*).

Відповідно, існує нагальна необхідність у виявленні молекулярних механізмів реакції стресу за дії найбільш вживаних агрохімікатів нейротоксичної дії на хребетних тварин як нетаргетних організмів. Відтак, поставлена дисертантом мета є принципово важливим, методологічно обґрунтованим завданням пріоритетної ваги у оцінці молекулярних основ біобезпеки агрохімічного захисту, а обрана стратегія – з'ясування стану системи антиоксидантного захисту та балансу металів у організмі – теоретично обґрунтована.

Зв'язок з державними і галузевими програмами. Дисертаційна робота виконувалась згідно з планом науково-дослідних робіт Інституту біології тварин НААН у період з 2003 по 2015 рік за темами: ДР 0106U003042 “Дослідити вплив деяких пестицидів і важких металів на функціонування центральної нервової системи тварин та розробити рекомендації щодо попередження інтоксикації”, ДР 0111U006136 «Вивчити фізіолого-біохімічні особливості метаболізму у тварин під дією окремих трофічних і біогеохімічних факторів і розробити методи його коригування».

Наукова новизна одержаних результатів полягає у створенні доказової бази щодо стану системи антиоксидантного захисту щурів на різних етапах після гострого отруєння та за хронічної дії хлорпірифосу та карбофурану залежно від концентрації чинника та у різних тканинах організму, у тому числі й відділах головного мозку. Вперше системно досліджено баланс великого спектру металів (металом) і встановлено суттєві його порушення не лише у тканині мозку, але й у печінці та нирках, що свідчить про глибокі системні зміни білохімічних процесів та їх регуляції. За допомогою імуно-гістохімічного аналізу функціонального стану нервової системи у організмі щурів та на культурах нейронів доведено, що ключову роль у механізмах нейротоксичності досліджених пестицидів відіграє оксидаційний стрес. Оцінка поведінкових характеристик тварин стала вагомим аргументом при визначенні ступеню ураження організму у динаміці впливу пестицидів.

Практичне значення і перспектива роботи пов'язані з формуванням вагової аргументації для посилення контролю за використанням препаратів хлорпірифосу та карбофурану та їх вмістом у аграрній продукції. Отримані результати свідчать, що поряд з порушенням передачі сигналів у холінергічних синапсах, фосфоорганічні та тіокарбаматні пестициди викликають у нетаргетному організмі низку неспецифічних реакцій, що визначають токсичний ефект цих препаратів. Ці знання можуть бути використані для вдосконалення існуючих засобів захисту, профілактики і лікування організму за отруєння пестицидами та розробки стратегії терапії на принципово новій основі. Результат дисертаційного дослідження лягли в основу патенту України на корисну модель № 85700 (від 25. 11. 2013) «Спосіб визначення нейротоксичності хлорпірифосу за умов культури нервових клітин».

Популяризація цих знань та впровадження у навчальні дисципліни є також важливим напрямком практичного використання отриманих результатів. Слід зазначити, що Юрій Салига має вагомий досвід у цій царині та популяризатором цієї тематики, у чому легко переконатися, задавши пошук у системі Google (українсько- та англійськомовних джерел).

Структура роботи

Дисертаційна робота викладена на 359 стор (270 стор основної частини) комп'ютерного набору та побудована за традиційною схемою. Вона складається зі вступу, аналітичного огляду літератури (стор. 15–55, 15,4% основної частини), матеріалів і методів дослідження (стор. 56–91), розділів, присвячених результатам власних досліджень (стор. 92–244) та їх аналізу (стор. 245–273), завершується 12-ма висновками, списком використаної літератури (770 найменувань, з яких 557 латиницею) та 6-ма додатками. Співвідношення та обсяг окремих частин роботи відповідають рекомендаціям МОН

України. Результати роботи проілюстровані 40 рисунками (з яких 4 повністю займають площу сторінки) та 107 таблицями.

У **«Вступі»** автор, базуючись на великому колі джерел літератури, обґрунтовує актуальність власного дослідження зростаючими ризиками інтоксикації засобами хімічного захисту, військовими отрутами та обмеженим уявленням про токсичність фосфоорганічних та карбаматних сполук, яке базується лише на констатації їх нейротоксичності. Відповідно аргументується необхідність системного дослідження окисно-відновного гомеостазу у тваринному організмі та його ймовірної детермінації як неспецифічною реакцією на стрес, так і безпосередньою участю у окисному метаболізмі цих сполук. Тут варто було серед великого загалу посилянь, що аргументують мету роботи навести конкретні аргументи щодо реакцій окиснення ХПФ та КФ як ключових у їх метаболізмі (наприклад, Gupta et al., 1994; Jaiswal et al., 2013). Дисертант окреслює коло біоіндикаторних об'єктів, що включає як і реакції на рівні організму, так і на клітинному рівні на моделях клітин нервової системи *in vitro*. Сформульовані завдання повністю розкривають поставлену мету. Вони включають багаторівневу і різнопланову оцінку ймовірних причин нейротоксичності хлорпирифосу та карбофурану, у тому числі аналіз впливу гострої та хронічної інтоксикації за різних концентрацій/доз чинників, визначення параметрів окисативного стресу, вмісту низки металів, цитотоксичності. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

У **Огляді літератури** у п'яти підрозділах розглянуто і проаналізовано наявні у літературі дані про загальні закономірності нейротоксичності фосфоорганічних (ФОС) та карбаматних сполук та біохімічні і фізіологічні особливості впливу на організм тварин їх представників – хлорпирифосу і карбофурану. Автор констатує однотипну дію хлорпирифосу та карбофурану як інгібіторів холінестераз за гідроксогрупою серину активного центру, подає перелік ензимів з холінестеразною активністю, як ацетил- та бутирилхолінестераз та аналізує відмінності у їх інгібувальній дії. Разом з тим, у критичному аналізі відзначається і недостатній рівіень знань про вторинні механізми активності та вплив хронічного вживання ФОС на нецільові тканини та органи та вторинні мішені ФОС. Окремо виділено аналіз джерел літератури, присвячених вивченню ролі гомеостазу металів у функціонуванні нервової системи хребетних тварин та взаємозв'язку між метаболізмом металів та окисним стресом, а також їх впливу на дію факторів транскрипції та генотоксичні ушкодження. Огляд базується на ґрунтовному аналізі великої кількості джерел літератури, як класичних, так і сучасних. Зокрема, автор провів ретельний та кваліфікований огляд джерел літератури англійською мовою, навів якісний ілюстративний матеріал (схеми, таблиці). Разом з тим, традиційний для Оглядів літератури підрозділ 1.4.1. (Окисативний стрес та його біохімічні особливості), на нашу думку, містить хрестоматійні факти, що не додає до інформативності у досліджуваній тематиці.

У Розділі **«Матеріали і методи досліджень»** детально висвітлюються схеми експерименту. Їх застосування не викликає заперечень та дозволяє різнобічно і ґрунтовно дослідити вплив препаратів ХПФ та карбофурану за дії гостротоксичних та хронічних доз. Для оцінки стану системи антиоксидантного захисту та холінестеразної активності використовуються класичні методи біохімічного аналізу. Зокрема, це методи загальної холінестеразної (за зміною кислотності середовища внаслідок вивільнення оцтової кислоти), супероксиддисмутазної активності, каталазної активності за Корольюком, глутатіону відновленого як загального вмісту низькомолекулярних тіолів, що не додає отриманим результатам високої конкурентноздатності. Безумовно диференційований аналіз Cu,Zn- та Mn-SOD, спектру ензимів із холінестеразною активністю, а також визначення власне вмісту відновленого глутатіону ензимним методом та його редокс-індексу посилив би рівіень доказовості на молекулярному рівні. Зокрема, щодо визначення

холінестеразної (ХЕ) активності, слід було диференційовано визначити активність її форм залежно від субстратів, адже різні ХЕ-зи зазнають як незворотнього, так і зворотнього інгібування тим самим препаратом, а також використати чутливіший метод, що ґрунтується на визначенні кількості тіолів, вивільнених внаслідок гідролізу ацетилтіохолінїодиду.

Разом з тим, аналіз первинних культур нервових клітин демонструє високу майстерність і повністю відповідає сучасним вимогам до рівня аналітичних методів. На схвалення заслуговує застосування поведінкових тестів на лабораторних тваринах, яке дозволяє на фізіологічному рівні оцінити чутливість молекулярних реакцій детоксикації та адаптації до впливу чинників.

Розділ *Результати досліджень та їх обговорення* складається з семи підрозділів. На нашу думку, слід було об'єднати у окремі змістовні блоки підрозділи, що присвячені вивченню гострої токсичності (різний час, різні концентрації) та підрозділи, що інформують про хронічний вплив за різних способів дії ХПФ, що би дозволило послідовніше простежити динаміку впливу препарату. Порівняння даних, наведених, у різних підрозділах, свідчить, що за низкою ознак отримано узгоджені факти для інтервалу 1 доба з моменту отруєння, встановлено дозову залежність та визначено найбільш чутливі показники. У **підрозділі 3.1.** доведено, що вплив одноразової інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату проявився як інгібувальна дія на ХЕ активність у сироватці крові. Дисертант обґрунтовує, що ця активність визначається присутністю бутирилхолінестерази (БХЕ), що визначило й інтерпретацію отриманих результатів. Лише на 6-ту добу експерименту активність ХЕ наблизилась до контрольних значень. Отримано також інші свідчення високої токсичності препарату за станом системи антиоксидантного захисту (АОЗ) крові та маркерів ураження тканин (активностей АлАт та АсАТ у плазмі крові). Лише на 10-ту добу активність трансаміназ у плазмі крові дослідних тварин відповідала показникам контрольної групи. Разом з тим, інтенсивність катаболізму амінокислот у тварин дослідних груп була практично такою ж, як у інтактних щурів. Відтак, бутирилхолінестеразна активність у сироватці, свідчить про класичний рівень регенерації цього ензиму у печінці, де його період пів-життя становить близько двох тижнів.

За гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг було проаналізовано й стан системи глутатіону за характеристиками ензимної активності та вмістом низькомолекулярних тіолів. Отримані результати продемонстрували, що вміст тіолів у еритроцитах суттєво зменшується, що найбільш ймовірно, пояснюється посиленням окисних процесів. Зміни у активності ензимів обміну глутатіону також відзначені автором, але їх інтерпретація, на нашу думку, ускладнюється поліфункціональністю цього тіолу. Тим не менш, проведений експеримент демонструє, що у піддослідних тварин спостерігається некомпенсований оксидативний стрес. Разом з тим, у тканинах мозку введення ХПФ призвело до істотного зростання вмісту низькомолекулярних тіолів, що потребує детальнішого аналізу. Як слушно відзначає дисертант, редокс стан клітин, тобто співвідношення НАДН/НАД⁺ може бути рушійним чинником зміни активності глутатіон-залежних ензимів. Слід додати, що в еритроцитах, залучення системи глутатіону у підтримання відновного стану Феруму гемоглобіну, надає характеристиці вмісту глутатіону статусу важливого біомаркера.

Відповідно, дисертантом було досліджено динаміку показників вмісту металів у тканинах щурів за впливу ХПФ у дозі 30 мг/кг. Аналіз вмісту металів – Купруму, Мангану, Цинку, Феруму, Магнію, Кобальту і Нікелю (широкий спектр яких можна кваліфікувати як дослідження металому) у тканинах різних органів інтоксикованих щурів довів, що за впливу ХПФ спостерігаються суттєві (у діапазоні 50% і більше) зміни вмісту цих металів у досліджуваних тканинах головного мозку. Було би доречно проаналізувати зміни співвідношення вмісту редокс-активних та редокс-стабільних металів. Особливо важливо, що інтоксикація призвела до зниження вмісту Купруму, який безпосередньо

здіяний у редокс-залежні метаболічні процеси. Крім того, доведено високий позитивний кореляційний зв'язок між Цинком та Манганом. Надзвичайно цікавим у теоретичному і практичному сенсі є результати про різкий дисбаланс вмісту металів у тканині нирок (Табл. 3.17–3.22). Дисертант пропонує логічну схему взаємозв'язку між дисбалансом металів та станом системи антиоксидантного захисту для пояснення впливу ХПФ на організм, яка, проте, має гіпотетичний характер, оскільки конкретний розподіл металів між клітинними мішенями не визначався. Крім істотних змін у рівні біохімічних характеристик за даної схеми дослідження спостерігались і поведінкові порушення. Зокрема, встановлено, що ХПФ чинить негативний вплив на механізми просторової орієнтації та спричиняє порушення довготривалої пам'яті у щурів.

Підрозділ 3.2. присвячено вивченню впливу ХПФ у дозах 15 і 30 мг/кг на стан показників АОС у відділах головного мозку, а також на вміст металів у тканинах різних органів щурів через 24 год після інтоксикації. У цій серії дослідів було доведено, що токсичність ХПФ проявляється як суттєве пригнічення чинників антиоксидантного захисту, зокрема СОД-активності у корі великих півкуль. Дисертант пропонує інтєрпретацію цього факту, проте не підкріплює його конкретними аргументами. На нашу думку, доречно порівняти результати підрозділів 3.1 та 3.2 та зробити висновок про вищу чутливість СОД у корі великих півкуль, ніж інших відділах головного мозку та еритроцитах. Продовживши низку порівнянь результатів, висвітлених у підрозділах 3.1 та 3.2, можемо відзначити дозову залежність дії ХПФ на 1 добу після гострого отруєння та найвищу чутливість системи антиоксидантного захисту у корі головного мозку. Слід додати, що у інтерпретації отриманих результатів додало би інформативності використання даних щодо СОД-активності фактів, повідомлених у монографії Леслі Паккера (L. Packer, 20002) щодо особливо високої частки мітохондріальної активності СОД у мозку щурів порівняно з іншими тканинами. На наш погляд, ця обставина може пояснювати і результати, отримані дисертантом та ще раз свідчить про доречність визначення окремих форм СОД, а не лише її загальної активності.

Дослідження хронічного впливу ХПФ у дозі 15 мг/кг на стан системи антиоксидантного захисту та вміст металів у різних відділах головного мозку щурів (**Підрозділ 3.3**) показало, що і за такої експериментальної схеми в них спостерігається зниження СОД- та глутатіонпероксидазної активностей. Окисний стрес у цьому випадку підтверджується і зростанням концентрації ТБК-активних продуктів. Проте, зміни вмісту металів (цинку, купруму, кобальту) мають часто різнонаправлений характер у корі головного мозку, гіпокампі та мозочку.

Як справедливо відзначає автор, дермальний шлях надходження пестициду, результати дослідження якого висвітлені у **Підрозділі 3.4**, залишається одним з найменш вивчених, проте й найбільш реальним для природних умов. Було обрано дві досить високі концентрації чинника, дію яких досліджували протягом 30 діб аплікацій. За такої схеми експерименту було доведено, що щоденне надходження в організм ХПФ викликає чутливу реакцію системи глутатіону. Виявлено пригнічення активності глутатіон-залежних ензимів та зменшення рівня низькомолекулярних тіолів у певних тканинах, причому найбільш чутливими виявились тканини нирок (за активністю ензимів) та печінки, де вміст тіолів зменшився на близько 30% порівняно з контролем. Поряд з цим, тканини мозку не проявляли такої чутливості, що, на нашу думку, свідчить про критичне значення метаболізму препарату у печінці для його біологічного ефекту. Разом з тим, ознаки ураження ліпідів проявляються у тканинах нирки та, особливо, міокарду, мозку, а також печінки, де їх вміст зростає удвічі. Якщо реакція глутатіонової системи виявилась селективною залежно від тканини, то СОД та каталазна активності пригнічувались практично у всіх досліджених тканинах, особливо у мозку. Важливо, що маркери окисного стреса виявились значно чутливішими до дії ХПФ, ніж гістоморфологічні та поведінкові реакції.

Результати, наведені у **Підрозділі 3.5**, доповнюють картину гострої токсичності ХПФ її оцінкою у першу годину після отруєння. Дуже важливо, що встановлено ранню реакцію тканини печінки, яка проявляється як пригнічення ХЕ активності у сироватці крові, тобто активності бутирилхолінестерази, що синтезується у тканині печінки. Не зважаючи на певне відтворення цієї активності у динаміці, за означений термін не відбулося її повна нормалізація. За початковий період токсичної дії ХПФ було зафіксовано як різке зростання активності лужної фосфатази, так і пригнічення глутатіонової системи. Ці результати, які відбивають вплив ХПФ у ранній динаміці, варто було продемонструвати наочно за допомогою графіків, а не у таблицях. Крім того, саме у цей час спостерігалось найбільш яскраво виражене розбалансування СОД та каталазної активності, наслідком чого вже на 45– 60 хв може бути активація ПОЛ. Разом з тим, на перших етапах гостротоксичної дії ХПФ спостерігалась захисна реакція системи антиоксидантного захисту, виражена як активація СОД, проте не каталази. У цьому підрозділі наведені й результати вивчення впливу ХПФ на вміст металів у тканинах, які свідчать, що дизбаланс металів спостерігається вже на ранніх стадіях токсичності, особливо у тканині нирок. Як відомо, саме дизбаланс Ферум/Марганець проявляється як спотворення активності системи глутатіону у тканині мозку. Було би важливо проаналізувати цю залежність за впливу ХПФ, адже, згідно даних табл 3.95, вміст Мангану у мозку зростає вірогідно ($\uparrow 35,5\%$), а рівень Феруму не зазнає вірогідних змін ($\downarrow 15,5$).

Важливою складовою роботи є дослідження токсичної дії ХПФ на нейрони гіпокампу у культурі клітин (**підрозділ 3.6**). Дисертантом було розроблено і апробовано експериментальну схему отримання нейронів із застосуванням методу магнетофекції, що ґрунтується на перенесенні наночастинок з асоційованими на них нуклеїновими кислотами у клітини-мішені. Після внесення у культуральне середовище з нейронами ХПФ встановлювали частку живих клітин у динаміці дії цього чинника. Застосування цього підходу продемонструвало, що за таких умов відбуваються інтенсивні нейродегенеративні процеси, а саме ознаки лізису. Відтак, оцінка рівня ушкодження та загибелі нейронів гіпокампу за умов *in vitro* відповідає результатам оцінки чутливості системи антиоксидантного захисту та дизбалансу металів у тканинах щура, що дозволяє стверджувати про адекватність цих показників у виявленні механізмів токсичності ХПФ на організм тварин.

Важливим етапом доведення ролі окисного стресу у реакції організму на дії ХПФ була постановка експерименту із поєднаною дією ХПФ та антиоксидантного фактора Тролокс. Отримані результати свідчать про нейропротекторну дію препарату тролокса за різних концентрацій ХПФ за оцінкою кількості живих клітин, що слід було підкреслити при з'ясуванні практичної значимості дослідження.

Вплив карбофурану на біохімічні і нейрофізіологічні показники щурів (**підрозділ 3.7**) досліджувався за умов хронічної інтоксикації. На нашу думку, слід було більш переконливо аргументувати включення цього експерименту у логічну схему роботи. Разом з тим, карбофуран є, як і органофосфати, пестицидом нейротоксичної дії, а тому верифікація спільного алгоритму дії, що проявляється як оксидативний стрес, має важливе доказове значення у концепції, що формулюється автором.

З метою з'ясування проявів хронічного впливу карбофурану (КФ) на біохімічні і нейрофізіологічні параметри щурів було проведено низку експериментів з оцінки стану системи антиоксидантного захисту та вмісту металів у відділах головного мозку щурів. Результати показали специфічність реакції ензимів глутатіонової системи та вмісту низькомолекулярних тіолів у різних відділах головного мозку, що викликає інтерес до уточнення механізмів такої селективності. Інтерпретація даних таблиці 3.99. у тексті дисертації чітко засвідчує, що дисертантом відзначено специфічні, проте високочутливі зміни активності СОД (але не КАТ) у відділах головного мозку.

У **Розділі 4** дисертант підсумовує результати досліджень у інтегральному аналітичному огляді, де демонструє високий рівень теоретичних узагальнень та ерудиції у царині концепцій щодо механізмів окисного стресу та особливостей відділів головного мозку, обґрунтовуючи їх високу чутливість до окисного стресу. Разом з тим, при аналізі результатів дисертанту не вдалося уникнути повторної констатації встановлених фактів.

На прикладі ХПФ було розроблено спосіб прижиттєвого дослідження впливу ХПФ на ріст, розвиток і життєдіяльність нейронів гіпокампу в умовах *in vitro*, а отримані результати стали вагомим аргументом у доказовій базі автора щодо ролі окисного стресу за пошкоджувального впливу ХПФ на нервову систему щура, зокрема у експерименті із застосуванням корегуючого чинника - тролакса.

Відтак, у дисертаційному дослідженні доведено, що окисативний стрес є одним із важливих молекулярних механізмів, що призводить до нейродегенерації за впливу обох препаратів. Як справедливо зазначається у Розділі 4, ХПФ та КФ проявляють нейротоксичність, будучи незворотнім та зворотнім інгібіторами холінестеразної активності. Взаємозв'язок між цією інгібувальною дією, проявами окисного стресу та дизбалансу металів вдало відображає рис. 4.1. (Рис. 17 автореферату) Схема біохімічних механізмів токсичності.

Отже, отримані у дисертації результати аналізу біохімічних, цитологічних та фізіологічних показників на різних рівнях організації та у різних схемах гостротоксичного та хронічного ураження із аналізом біомаркерів, дозволяють стверджувати про ураження системи антиоксидантного захисту як вирішальну ланку реакції організму ссавців на вплив сполук фосфоорганічної та тіокарбаматної природи.

Автор формулює 12 **висновків**, які відображають сутність отриманих результатів та послідовно підсумовують отримані результати у логічній послідовності, що відповідає їх викладу у розділі 3.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій.

Сформульовані положення та висновки ґрунтуються на експериментальних даних, отриманих з дотриманням стандартних вимог до відбору проб, на достатній кількості повторностей в експерименті, з використанням різноманітних схем введення препаратів, широкого спектра методичних підходів та визначених показників. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже, ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

Недоліки по змісту і оформленню:

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є ряд питань дискусійного характеру, рекомендацій та зауважень до обраних методів, стилю і оформлення роботи.

Зауваження до застосованих методів та організації експерименту:

1. На нашу думку, спектр застосованих методів можна було посилити визначенням окремо Cu,Zn- та Mn-супероксиддисмутазної активності, редокс індексу глутатіону та доведенням ізоформного складу холінестерази.

2. У Розділі «**Матеріали і методи досліджень**» не вказано, чи спостерігалась летальність за дії чинників.

3. На С. 77. 2.5.15 - слід було подати перелік хімічних елементів, що визначався, а також вказати межу точності ввизначення. Варто було об'єднати перелік методів у змістовні блоки та, відповідно, позбутися зайвої рубрикації.

4. За дермального впливу препарат "Дурсбан" з концентрацією діючої речовини 480 г/л розводили у 50 або 5 разів, тобто до концентрацій 9,6 або 96 г/л. Чому автор вважає такі концентрації низькими, навіть за аплікацій протягом 3 хв? Розчинність його у воді становить при 25 °C 2 мг/л то ж у чому розводили?

Зауваження до стилю та оформлення результатів:

5. Узагальнена схема (Рис 4.1. дисертації та Рис. 17 автореферату) видається спекулятивною щодо демонстрації ролі металів у антиоксидантному захисті. Добре

відомими є конкурентні взаємозв'язки металів у детермінації цієї активності, які, проте, не можуть бути виявлені на рівні загальноного вмісту металу у тканині.

6. Очевидно, позначення відмінностей у таблицях між двома рядами даних (стрілками) випадку відсутності вірогідних змін не є коректним (наприклад, табл 3.95).

7. Некоректне твердження: «Цинк є редокс-інертним металом і не бере участі в окисно-відновних реакціях» (с. 55), адже іони цинку координуються тіоловими групами, що впливає на їх реактивну здатність.

8. Дисертант подекуди вживає термін «біохімічні особливості», наприклад Назва Підпідрозділу 1.4.1. Що він має на увазі під «біохімічними особливостями» у цьому формулюванні - особливості порівняно з фізіологічними особливостями, особливостей окисного стресу порівняно з особливостями відновного стресу, тощо?

9. У табл 5 автореферату та у табл. 3.99 дисертації присутнє спотворення статистичних даних щодо активності СОД (що є, очевидно, технічною помилкою).

10. Рис. 4.1 (Рис. 17 автореферату) Схема біохімічних механізмів токсичності стосується не лише ХПФ, як зазначається у підписі, а також КФ. Підрозділ 2.4.1. - зайва рубрикація

11. Трапляються граматичні огріхи, калька з англійської, наприклад: Поступове падіння вмісту ГВ в еритроцитах крові (С 247); мінеральними елементами (с 108); «Окисне з'єднання фенолу» (С 74); Дослідження токсичності ХПФ на нейрони (с. 210); «Зміни між інтактною і дослідною групами (насправді, відмінності)» (Табл 3.13-3.20).

12. Викликає сумніви точність вимірів каталазної активності у нирках (Табл. 3.72) у двох групах $0,15 \pm 0,003^{**}$ та $0,16 \pm 0,001$ (мкмоль/хв·мг протеїну), - зниження на 7% ($P < 0,01$).

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. Дисертація відповідає вимогам МОН України. Результати проведених автором досліджень повністю відображені у 57 публікаціях, у тому числі 25 статтях у фахових виданнях, 1 патенті, широко висвітлені на міжнародних конференціях. Юрій Салига є відомим спеціалістом у галузі та популяризатором цієї тематики, у чому легко переконатися, задавши тематичний пошук у системі Google (українсько- та англомовних джерел). Зміст автореферату відображає структуру і положення дисертації, які виносяться на захист.

На основі вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота **САЛИГИ ЮріяТарасовича «Фізіолого-біохімічні механізми впливу хлорпірифосу та карбофурану на організм тварин»** за актуальністю проблеми, методичними підходами, зробленими висновками, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів є завершеною науковою працею і відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою № 567 Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 (із змінами, внесеними згідно з постановами КМ № 656 від 19.08.2015 та № 1159 від 30.12.2015), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія.

Професор кафедри хімії та методики її навчання Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка доктор біологічних наук



4.05.2016 р.

О.Б. Столяр

