

До разової спеціалізованої вченої ради ДФ 58.053.020
Тернопільського національного педагогічного
університету імені Володимира Гнатюка
(46027, м. Тернопіль, вул. Максима Кривоноса, 2)

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Хоми Віри Вячеславівни на тему:
«Властивості металотіонеїнів двостулкового моллюска за впливу на організм
стресорних чинників хронічної та короткотривалої дії»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань
09-«Біології» за спеціальністю 091-«Біологія»

На сьогодні проблема забруднення водних об'єктів різними речовинами неорганічного (кислоти, луги, солі важких металів) та органічного (нафтопродукти, синтетичні миючі засоби, пестициди) походження набула загальнонаціонального масштабу. Однією з найсерйозніших екологічних загроз є посилення забруднення так званими «мікроорганічними забруднювачами», що включають речовини різноманітні за походженням та характером дії, зокрема фармацевтичні препарати, медичні та харчові відходи, біоактивні метаболіти тощо. Ці полютанти, навіть у наномолярних концентраціях, можуть проявляти низку токсичних ефектів на гідробіонтів. Їх токсичність в організмі істотно залежить від параметрів водного середовища, тому прогнозування реальних загроз для біоти комплексного забруднення новітніми ксенобіотиками на основі чутливих і специфічних біохімічних показників є актуальною проблемою екології та токсикології. Саме даній проблематиці приурочена дисертаційна робота Хоми Віри Вячеславівни, в якій авторка досліджує властивості металотіонеїнів двостулкового моллюска *Unio tumidus* за дії на їх організм Раундапу залежно від супутніх токсичних чинників. Двостулкові моллюски є визнаними біоіндикаторами стану водойм, так як вони мають унікальні властивості акумулювати ксенобіотики завдяки фільтруючому способу живлення та осілому способу існування.

Дисертаційна робота виконувалась у межах держбюджетних тем МОН України № 132Б «Екотоксикологічна оцінка впливу гідроелектростанцій на довкілля» (номер державної реєстрації 0118U003123), № М/35-2018

«Мультимаркерний підхід для оцінки впливу гідроелектростанцій на довкілля» (номер державної реєстрації 0117U003263) та №№ М/19-2020б М/70-2021 «Розробка набору біопроб - біомаркерів для оцінки впливу фармацевтичних препаратів на водні екосистеми» (номер державної реєстрації 0120U1103537).

Наукова новизна роботи полягає в тому, що авторкою вперше встановлено механізм дії Раундапу посередництвом прооксидантного впливу і опосередковано через модулювання метал-депонувальних властивостей металотіонеїнів та цинк-залежних протеїнів, зокрема каспази-3. Проаналізовано специфічні ознаки впливу фармацевтичних препаратів на стан металотіонеїнів, показники стресу та детоксикації в організмі двостулкових молюсків. У експерименті з блокатором цинку ТПЕНОм доведено, що пряма дія Раундапу на тканину травної залози молюска пов'язана з прооксидантним впливом та не впливає на депонувальну функцію МТ, щодо цинку, та активність цинк-залежної каспази-3.

Практичне значення одержаних результатів. Авторкою запропоновано систему оцінки якості водного середовища на основі характерних біохімічних показників двостулкових молюсків. Отримані дані щодо ступеня металювання металотіонеїнів у тканинах молюска можуть бути застосовані як оціночний критерій стійкості гідроекосистем. Напрацьована модель *ex vivo* запропонована для раннього діагностики токсичності суміші поллютантів.

Виходячи із зазначеного дисертанткою досягнуто поставлених теоретичних і практичних завдань, зміст досліджень розкриває проблему, що розглядається, глибина досліджень достатня для обґрунтування гіпотези та формулювання зроблених висновків.

Дисертаційна робота Хоми В.В. викладена на 159 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу та узагальнення, висновків, списку використаних джерел, який включає 228 посилань (з них 226 латиною). Робота ілюстрована 37 рисунками та 4 таблицями.

В огляді літератури проаналізовано структуру та властивості металотіонеїнів двостулкових молюсків, регуляцію їх експресії, роль у детоксикації металів. Літературний огляд достатньо інформативний, базується на посиланнях останніх років і побудований таким чином, що з нього логічно витікають завдання дослідження.

Розділ «матеріали та методи» детально висвітлює всі практичні процедури з постановки експериментів та лабораторного аналізу. Авторкою застосовані сучасні методи розподільчої хроматографії, електрофорезу в поліакриламідному гелі, спектрофотометричні, спектральні, мікроскопічні, статистичні.

Експериментальні результати та їх обговорення подані в розділі 3.

В підрозділі 3.1 розглядаються питання підбору оптимального складу елюента для виділення МТ методом гелі-розподільної хроматографії, з метою збереження метал-кластерної структури МТ. Показано, що лише елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу забезпечує характерні специфічні хроматографічні ознаки МТ та збереження цинку у зв'язаній МТ формі.

В підрозділі 3.2 дисертантка встановила, що за дії на організм 40 нМ Раундапу відмічалось зменшення акумулювальної функції травної залози молюска щодо цинку лише у поєднанні з тепловим чинником, тоді як удвічі вища концентрація Раундапу зменшувала майже удвічі вміст метальованої форми МТ. Препарати диклофенак та хлорпромазин призвели до підвищення акумуляції цинку в МТ. У комплексних експозиціях ефект Раундапу був домінуючим. Підвищення температури виявилось критичним фактором, що впливає на акумуляцію металу у складі МТ та його розподіл у клітині.

У підрозділі 3.3 авторка досліджує параметри системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження молюска за впливу на його організм ксенобіотиків при різних температурних режимах. Показано, що всі досліджені ксенобіотики проявляли проксидантний ефект. За дії на організм Раундапу спостерігається концентраційна залежність змін показників антиоксидантного стану: 40 нМ при 18⁰С активує супероксиддисмутазну активність, тоді як 80 нМ пригнічує її та викликає збільшення вмісту окисних модифікацій протеїнів.

Збільшення вмісту відновленого глутатіону за впливу Раундапу лише у випадку дії 80 нМ супроводжується збільшенням вмісту окисненого глутатіону. За впливу 40 нМ Раундапу при температурі 25⁰С активується система глутатіону, а супероксиддисмутазна та каталазна активності не змінюються порівняно з контролем. Дія на організм молюска препаратів диклофенаку, ніфедипіну та їх суміші з 80 нМ Раундапом (при 18⁰С) пригнічують супероксиддисмутазну активність, хлорпромазин – каталазну активність. Доведено, що вплив на організм хлорпромазину та його суміші з 40 нМ Раундапу викликає збільшення вмісту відновленого глутатіону та його редокс індекс. Диклофенак, ніфедипін та їх суміш з 80 нМ Раундапу (при 18⁰С) викликають зменшення редокс індексу глутатіону, а суміш при 25⁰С не впливає на нього. Обчислення інтегральних показників свідчить, що серед досліджених показників низькомолекулярні тіоли, глутатіон та MTSN є головними клітинними антиоксидантами, які визначають зміни балансу у системі за впливу на організм Раундапу та фармацевтичних препаратів поокремо та у сумішах.

У підрозділі 3.4 Хома В.В. досліджує параметри токсичності молюска *Unio tumidus* за впливу на організм ксенобіотиків при різних температурних режимах, а саме вплив диклофенаку, ніфедипіну та Раундапу окремо та у суміші за двох температурних режимів на показники токсичності. Авторкою доведено, що цитотоксичність Раундапу, що посилюється у залежності від зростання концентрації та теплового режиму. Для фармацевтичних препаратів ніфедипіну та хлорпромазину, що впливають на гомеостаз кальцію, підтверджено ефекти, встановлені на моделях вищих тварин, що надає ваги перспективі використання двостулкового молюска для оцінки екотоксичності фармацевтичних препаратів – регуляторів метаболізму металів. Важливо, що вплив ніфедипіну на ензими апоптозу є домінуючим і у сумішах, на відміну від Раундапу, для якого такі ефекти не виражені. Особливий вплив суміші ксенобіотиків та підвищеної температури – поєднана активація каспази-3 та вихід катепсину Д з лізосом – визначає верхню межу резистентності клітинного метаболізму за комплексного впливу пошкоджуючих чинників довкілля у дисертаційному дослідженні.

У підрозділі 3.5 дисертантка встановила, що Раундап не має прямого впливу на акумуляцію цинку у МТ, на відміну від ТПЕНу. Лише ТПЕН поокремо та за спільної з цинком дії викликав протилежні до дії цинку ефекти, зменшуючи рівень МТSH, збільшуючи каспазну-3 активність та лізосомальну стабільність. З іншого боку, Раундап мав прооксидантний ефект, знижуючи рівень GSH та лізосомальну стабільність, що відповідало результатам його впливу у субхронічному експерименті. Спільним проявом для всіх груп у цьому експерименті було зниження у 2-8 разів співвідношення GSH/GSSG, що указує на лімітуючі можливості інкубації тканини у агресивному середовищі.

Четвертий розділ приурочений аналізу та узагальненню одержаних результатів. Відмічено, що фармацевтичні препарати диклофенак, ніфедипін та хлорпромазин, які відомі як препарати, що впливають на транспорт та акцептування металів у клітинах таргетних організмів, у екологічно реальних концентраціях спричинюють низку специфічних реакцій металотіонеїнів, системи антиоксидантного захисту, ензимів апоптозу та функціонального стану лізосом. Показано, що більшість цих реакцій, за виключенням стабілізації лізосом, нівелюється за спільного впливу з Раундапом. Отримані результати вивчення комбінованого субхронічного (*in vivo*) та безпосереднього (*ex vivo*) впливу Раундапу та фармацевтичних препаратів у поєднанні з тепловим впливом на моллюска *U. tumidus* свідчать про перспективність запропонованих дослідних схем для оцінки екологічно реального впливу забруднювачів водного середовища на біоту.

Одержані дисертанткою дані ґрунтовно проаналізовані, обговорені, пов'язані з літературними повідомленнями. Висновки дисертації повністю витікають з експериментальних даних. Заслуговує на увагу опрацювання значної кількості наукової літератури, яка безпосередньо стосується досліджуваної теми. Це свідчить про високу обізнаність, скрупульозність та наукову відповідальність авторки.

Разом з тим до роботи можна висловити окремі зауваження та запитання:

1. Якщо можна детальніше розкажіть чому взяли саме такі концентрації? Мова про нанозначення і відразу постає питання:

чому концентрація лікарських препаратів майже в 40 разів нижча від концентрації Раундапу?

2. Хотілося б також почути більше про механізми взаємодії цих ксенбіотиків в організмі молюсків – це синергізм антагонізм чи адитивна дія?
3. Чим пояснити, що у експерименті *ex vivo* Раундап (який по суті виступає лігандом), на відміну від хелатора цинку ТПЕНу, не блокує акумуляцію цинку у металотіонеїнах. Чи відомі Вам константи стійкості цих комплексів
4. Як контролювали протягом експерименту концентрації препаратів (діючих речовин)? Чи не руйнувалися вони мікроорганізмами? Адже мова іде про наноконцентрації.

Проте, зауваження і побажання не зменшують цінність дисертаційної роботи, а лише дають змогу провести цікаву наукову дискусію із зазначеного напрямку дослідження.

Апробація роботи. За матеріалами дисертації опубліковано 17 праць, у тому числі 1 патент на корисну модель. 4 статті, що входять до наукометричної бази даних Scopus та 2 статті у наукових фахових виданнях, а також 10 матеріалів та тез доповідей на з'їздах, конференціях та конгресах.

Анотація у повній мірі відображає зміст роботи. Вона не містить тверджень чи ідей, які не наведені в основному тексті дисертації.

Праця написана змістовно, літературною мовою, стиль викладення матеріалу науковий, думки висловлені логічно та послідовно.

На основі всього вище переліченого вважаю, що дисертаційна робота Хоми Віри Вячеславівни на тему «Властивості металотіонеїнів двостулкового молюска за впливу на організм стресорних чинників хронічної та короткотривалої дії», яка подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своїм науковим рівнем та практичною цінністю, змістом та оформленням відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» затвердженого

Постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. №44 та сучасним вимогам до оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40, а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент:

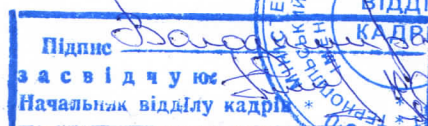
кандидат біологічних наук,

доцент кафедри хімії та методики її навчання

Тернопільського національного педагогічного

університету імені Володимира Гнатюка

Володимир ХОМЕНЧУК



18.11.2022