

До разової спеціалізованої вченої ради ДФ 58.053.041
Тернопільського національного педагогічного
університету імені Володимира Гнатюка
(46027, м. Тернопіль, вул. Максима Кривоноса, 2)

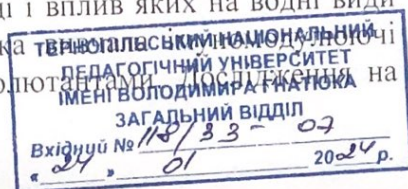
ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук,
професора, завідувача кафедри біохімії та біотехнології
Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника
Марії БАЙЛЯК

на дисертаційну роботу Тетяни МАЦЬКІВ
«Дослідження ролі металотіонеїнів у запальних процесах на моделях
двостулкового моллюска *Dreissena polymorpha* та лабораторних щурів»,
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань
09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми. Металотіонеїни (МТ), низькомолекулярні цистеїн-вмісні метал-зв'язуючі протеїни, раніше вважалися медіаторами детоксикації важких металів через їх високу спорідненість до цих металів, але тепер відомо, що вони також беруть участь у різноманітних клітинних процесах, таких як анти-оксидація, проліферація, міграція та апоптоз. Значною мірою це зумовлено тим, що металотіонеїни відіграють важливу роль у депонуванні та розподілі есенціального цинку та міді, а також виконують антиоксидантні функції через наявність великої кількості тіольних груп. Завдяки багатогранності функцій та повсюдній поширеності у живому світі металотіонеїни також активно вивчаються як біомаркери забруднення водних екосистем різними політантами. Низкою досліджень також показано, що рівень МТ зростає і при запальних процесах в організмі. Одного боку, давно відомо, що Zn і Cu беруть участь у розвитку та функціонуванні вроджених та адаптивних ланок нашої імунної системи. З іншого боку, про механізми, які б пов'язували реакції запалення та функціонування металотіонеїнів на сьогодні відомо мало. Глибше розуміння імунорегуляторної ролі МТ обіцяє підняти цей клас білків у терапевтичній драбині, спрямованій на боротьбу з інфекціями та незліченними захворюваннями, які зачіпають імунітет. З огляду на це, дисертаційна робота Тетяни Мацьків, яка присвячена вивченню ролі МТ за експериментального впливу імуномодуляторних чинників, є актуальною та затребуваною у теоретичному та практичному відношенні. У роботі також розв'язується інше важливе наукове питання – встановлення консервативності функцій МТ у популяційному контексті та у різних філогенетичних груп, а саме на прикладі безхребетних – двох популяцій, автохтонної та інвазійної, двостулкового моллюска *Dreissena polymorpha* та теплокровних хребетних – щурів. У цьому плані дисертаційна робота є досить новаторською.

Як імуномодуляторні чинники для моллюсків, дисертанткою разом з керівницею обрано кофеїн та мікропластик, які є одними з найбільш поширених мікрополітантів, присутніх у водному середовищі і вплив яких на водні види тварин вивчений недостатньо. Також дисертанткою дослідження на ефекти температури води у комплексі з мікрополітантами.



щурях включали оцінку ролі МТ та інших показників про-/антиоксидації у тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартритом. Такий комплексний характер роботи становить значний інтерес не тільки з точки зору біохімії, але і водної екотоксикології та біомедицини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах держбюджетної теми МОН України М/84-2021 (№ державної реєстрації 0121U113543); М/13-2022 (№ державної реєстрації 0122U002428) «Імунологічне та біохімічне порівняння резистентності інвазивних і природних двостулкових молюсків до впливу викликів довкілля» та дослідницької програми РНС DNIPRO №46800RK спільно з Університетом Реймса Шампань-Арденни (URCA) (Франція).

Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дизайн експериментів спланований відповідно до поставленої мети і дозволив отримати вичерпні відповіді на поставлені завдання. Сформульовані у роботі положення і твердження є добре обґрунтованими, чому сприяє значний обсяг проаналізованих літературних джерел останніх років, а коректно підібрані статистичні методи дослідження підтверджують достовірність отриманих результатів. Результати та висновки відповідають поставленій меті і завданням дисертаційної роботи. Набір лабораторних експериментальних досліджень є оптимальним для реалізації поставлених завдань. Проаналізована робота написана державною мовою, а отримані висновки є достатньою мірою логічними, послідовними та обґрунтованими.

Структура дисертації. Загальний обсяг дисертації 184 сторінки комп'ютерного набору. Складається зі анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, переліку використаних джерел, який включає 286 джерел (з них 285 латиною). Робота ілюстрована 33 рисунками та 8 таблицями.

Анотація адекватно висвітлює зміст всіх розділів дисертації.

В огляді літератури доцільно розглядається роль та функції низькомолекулярних тіол-вмісних сполук та їх участь в антиоксидантному захисті. Детально розкрито питання функціонування металотіонеїнів за нормальних фізіологічних умов. Також проаналізована наявна на сьогодні інформація щодо ролі МТ у запальних процесах. Розкрито проблему забруднення прісних водойм одними з найбільш поширених мікрополітантів – кофеїном та мікропластиком, та обґрунтована їх участь як імуномодуючих стресорів при впливі на водні організми. Загалом, дисертанткою системно проаналізована достатня кількість літературних джерел, які дозволила чітко окреслити невирішені питання.

Розділ «**Матеріали та методи дослідження**» детально описує усі експериментальні процедури та методи досліджень, використані у роботі, зокрема, спектрофотометричні, гістологічні та мікроскопічні аналізи, морфометрію, гель-розподільчу хроматографію та електрофорез, методи математичної статистики. Методи підібрані адекватно та відповідають меті роботи.

Розділ 3, який складається з 3 підрозділів, вміщує опис отриманих експериментальних результатів та їх обговорення.

Підрозділ 3.1. представляє результати, отримані при дослідженні металотіонеїнів аборигенних та інвазивних молюсків та лабораторних щурів за впливу імуномодуючих стресорів при різних температурних режимах та умов запалення. Дисертантка демонструє посилення антиоксидантного потенціалу металотіонеїнів та зростання частки їх апо-форми при усіх експозиційних схемах, що доводить уніфікованість відповіді цих поліфункціональних тіолів. Важливо, що у аборигенних особин молюсків, як і при запаленні у щурів, специфіка відповіді простежувалась також і у зростанні рівня металювання металотіонеїнів та посиленні їхніх цинк-буферних властивостей.

Дослідження показників окисного/відновного стресу у м'яких тканинах молюска та колінного суглобу щурів за впливу імуномодуючих чинників при різних температурних режимах та запаленні представлено у **підрозділі 3.2.** Відзначено пригнічення ензимів антиоксидантного захисту та посилення окисного стресу за впливу імуномодуючих стресорів у аборигенній популяції молюсків, тоді як вплив запалення у щурів викликав дисбаланс антиоксидантів та посилення перекисного окиснення ліпідів. Досліджено активність імуноензиму фенолоксидази, яка проявляла вищі рівні в інвазивній популяції молюсків, при цьому вплив підвищеної температури та суміші стресорів провокували одноставну її активацію у обох популяціях.

У **підрозділі 3.3.** оцінювались параметри цитотоксичності за умов впливів. Зокрема, відзначено вихід катепсину Д з лізосом та вищий рівень дестабілізації лізосомальних мембран у аборигенній популяції молюсків, що підтверджує вищий ступінь їх вразливості до досліджуваних чинників. Виявлено пригнічення активності холінестерази за умов запалення у щурів, що свідчить про ураження нервових розгалужень у суглобах при стані гострого гонартриту.

У **розділі 4** наведено аналіз та узагальнення результатів дослідження. Дисертанткою здійснена відмінна статистична обробка отриманих результатів з використанням методів факторного та дискримінантного аналізу, які доводять взаємозв'язок між відповідями металотіонеїнів, показниками запального процесу та антиоксидантного захисту та виявляють високу специфічність відповідей аборигенних груп молюсків на вплив стресорних чинників та відносно низьку специфічність у інвазивних груп. Доведено імунорегулюючу роль металотіонеїнів, яка реалізовується шляхом калібрування доступності цинку при запальних процесах. Запропоновано механізм відповіді цих поліфункціональних тіолів у патогенезі запальних та дегенеративно-дистрофічних захворювань суглобової тканини. На прикладі молюсків наведено докази синергічного ефекту при впливі суміші стресорів. Проаналізовано міжпопуляційні відмінності у відповідях аборигенної та інвазивної популяції молюсків на вплив токсикантів та підвищеної температури.

Дисертантка формулює 7 висновків, які відповідають поставленим завданням та витікають із результатів проведеного дослідження.

Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та отриманих результатів. Серед низки отриманих результатів дослідження відзначаю

набій, над впливом ту отримано контроль. Вторинні вислідні показували вмістність функціональних металотіонінів у абсорбенті та металічних особливих зв'язуваннях металів (D) робити згідно з оцінками змін вмісту та їх динамікою, ряснішою на збільшенням вмісту функціональних структур. Вторинні вислідні показують металотіоніни у спонтанній ланковій лабораторній справі та змінює кількісність та експериментальний контроль експресії генов, та призначено доведень на металотіоніни і провідники гексатриф фазі зв'язання. Уторинні запропоновано металісти функціональних металотіонінів у патологічному середовищі в станіх гексатриф металіст-деструктивному процесу. Вторинні доведень універсальний вислідні вказує на функціональну активність металотіонінів та експресивну активність, окислювальну стресу та цитотоксичність на морфологічному впливі на організм. Уторинні співставлення двох характеристик металотіонінів – та вислості позитивних груп та цитотоксичності ферми на двох експериментальних моделях доведено, що ці процеси беруть участь у редокс-реактивності організму на стресовій митохондрій відмінно від їх типових індустрів – переходних металів.

Повинна викладу основних наукових положень. Відповідно встановленому вимогам Міністерства освіти і науки України. За результатами дисертації опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 1 патент на користувача, 2 статті у виданнях бази даних Scopus, 7 – матеріали і тези доповідей на з'їздах і конференціях.

Дискусійні питання, побажання та зауваження:

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є ряд питань дискусійного або уточнювального характеру та зауваження до оформлення.

1. Молоски абсорбентної та ініціальної популяції мали різні морфологічні показники. Можливо, вони мали різний вік? Чи це все-таки вплив умов середовища?
2. Кофеїн був використаний як прозапальний чи антизапальний стресор для молосків?
3. Як м'які тканини молоска брали для аналізу? І чи виходували, що ефекти можуть бути тканинно-специфічними?
4. У методах вказано, що шурів для контрольної і дослідної групи брали по 10 особин, але у описі результатів говориться про 8 особин.
5. На мою думку, у дослідженні доцільним було б визначити активність глутатіон S-трансферази – ферменту детоксикації ксенобіотиків, а також ферменту, який впливає на пул відновленого глутатіону.
6. Яким чином все-таки можна пояснити популяційні відмінності у рівню рівня металювання металотіонінів у молосків контрольних груп, виходячи з обсягу отриманих даних?
7. Який потенційний механізм регіональованих змін в активності супероксиддисмутаз та каталази у частині проведених експериментів?
8. Мета роботи сфокусована на ролі металотіонінів у запальних процесах, проте імунологічних показників у роботі наведено недостатньо. Фенолооксидазна та лакказна активність не є чітким показником для характеристики імуномодулюючого впливу мікропластику та кофеїну. Чи

спостерігали якісь візуальні зміни у тканинах молюсків, наприклад посилення виділення слизу чи збільшення його в'язкості? Які імуномаркери можна було б використати додатково?

9. У роботі аргументовано використаний факторний аналіз, проте варто було б дати десь роз'яснення, що таке фактор 1 і фактор 2 у цьому аналізі.

10. Наявні дрібні друкарські огріхи, русизми як-от: «у якості модельних організмів» замість «як модельні організми»; «у свою чергу» замість «своєю чергою»; «згідно отриманих» замість «згідно з отриманими». Вживаються одночасно і україномовні скорочення і англійські певних термінів, що творить трохи плутанину; н-д, для позначення гонартриту використовується GA і GA.

Загалом, наведені коментарі не знижують цінність роботи та не впливають на загальну оцінку.

Висновок

Загалом, вважаю що, за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем і практичним значенням дисертаційна робота Тетяни МАЦЬКІВ «Дослідження ролі металотіонеїнів у запальних процесах на моделях двостулкового молюска *Dreissena polymorpha* та лабораторних щурів», подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії, відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., №44, а здобувачка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

доктор біологічних наук, професор
завідувач кафедри біохімії та біотехнології
Прикарпатського національного університету
імені Василя Стефаника

Марія БАЙЛЯК

