

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

### ВІДГУК

*офіційного опонента, доктора біологічних наук,  
професора кафедри біохімії та біотехнології*

*Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника*

***Луцака Володимира Івановича***

*на дисертаційне дослідження Хоми Віри Вячеславівни на тему: «Властивості металотіонеїнів двостулкового молюска за впливу на організм стресорних чинників хронічної та короткотривалої дії» представлене на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 - Біологія*

#### **Актуальність теми дисертаційної роботи.**

Протягом останніх десятиліть забруднення води є однією з найсерйозніших загроз довкілля. У сучасному складі забруднювачів водного середовища пріоритетними визнаються «мікроорганічні забруднювачі», до яких належать речовини побутового та сільськогосподарського походження, зокрема фармацевтичні препарати, засоби особистого вжитку та відходи сільського господарства. Біологічна небезпека цих чинників у водоймах ускладнюється непрогнозованою поведінкою їх комбінованої дії та у поєднанні з температурними аномаліями. Тому видається обґрунтованим обрання для дослідження біологічної дії поширених у водоймах традиційних та новітніх забруднювачів – гербіциду Раундапу (комерційна форма гліфосату), фармацевтичних препаратів ніфедипіну, диклофенаку, хлорпромазину та теплового впливу, поєднання яких дозволяє моделювати комбіновану дію несприятливих чинників довкілля на водні організми

Двостулкові молюски належать до найчастіше вживаних біоіндикаторів забруднення водойм, а їх протеїни металотіонеїни традиційно використовуються як біомаркери токсичності металів. Разом з тим, у науковому колективі, де виконано роботу, наявний оригінальний досвід дослідження металотіонеїнів як складників клітинного тіолому, які, завдяки реактивній сірці, поєднують здатність депонувати іони металів та антиоксидантну функції. Важливо, що кожен з досліджуваних чинників, окрім специфічних цільових ефектів та індукції оксидативного стресу, може впливати на гомеостаз металів, як безпосередній хелатор та/або регулятор метал-транспортні канали. Проте властивості металотіонеїнів молюска як потенційної цільової молекули для дії раундапу та фармацевтичних препаратів практично недосліджені. Тому обрана

СЕКРЕТАРІАТ  
ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА  
КАНЦЕЛЯРІА  
Відомий № 1006/33-03.02  
"18" "11" 2022 р.



тема дисертаційного дослідження присвячена дослідженню особливостей металдепонувальних властивостей та антиоксидантного потенціалу металотіонеїнів двостулкового моллюска *Unio tumidus* за субхронічного та короткотривалого впливу ксенобіотиків з метал-хелатуючими властивостями, є актуальним завданням.

**Зв'язок дисертаційного дослідження із науковими програмами, планами, темами.**

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).

### **Структура роботи.**

Дисертація викладена на 159 сторінках комп'ютерного набору тексту за традиційною схемою, включаючи вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, результати роботи та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів, висновки, вона містить 37 рисунків та 4 таблиці, а список використаних джерел складає 228 джерел, здебільшого англійською мовою та опублікованих в останні десятиліття, що свідчить про обізнаність із сучасним станом галузі дослідження.

У вступі авторка наводить слушні аргументи актуальності роботи та коректно визначає мету та відповідні завдання, спрямовані на її реалізацію, об'єкт та предмет дослідження.

**Огляд літератури** складається з двох підрозділів, що містять сучасну інформацію про властивості металотіонеїнів, їх роль у діагностиці токсичності водного середовища та біохімічні реакції водних організмів на вплив новітніх ксенобіотиків, таких як Раундап, диклофенак, ніфедипін та хлорпромазин. Огляд інформативний, становить теоретичне підґрунтя для аналізу отриманих результатів та відображає компетентність дисертантки у темі дослідження. Разом з тим, у ньому відсутні посилання на принципові роботи, присвячені впливу Раундапу на систему окисного стресу водних тварин, зокрема Lushchak OV et al. 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.04.045).

У розділі «**Матеріали і методи**» деталізовано практичні процедури з формування дослідних серій та лабораторного аналізу. У дослідженні використано сучасні методи фізико-хімічного та біохімічного аналізу (зокрема хроматографічні, спектральні, електрофоретичний). Спектр застосованих методів відповідає поставленій меті та завданням дослідження. Особливо слід відзначити, що отримані дані опрацьовано за допомогою сучасного набору



методів математичної статистики, що значно посилило аналітичну базу роботи. В описі застосованих методів дисертантка не уникла типового недоліку зайвої деталізації для загальновідомих методів лабораторного аналізу (2.2.2, 2.2.4, 2.4.1, тощо).

**Розділ «Результати та їх обговорення»** складається п'яти підрозділів. У **підрозділі 3.1.** авторка здійснює підбір оптимального складу елюента для виділення металотіонеїнів методом гель-розподільної хроматографії з метою збереження метал-кластерної структури металотіонеїнів. Цей елемент роботи сприяє верифікації отриманих результатів.

У **підрозділі 3.2.** авторка демонструє, що кожен досліджений чинник впливає на концентрацію металотіонеїнів у тканині травної залози молюска та їх участь у розподілі цинку у тканині, причому ефекти Раундапу та фармацевтичних препаратів були, здебільшого, протилежними, а в комплексних експозиціях ефект Раундапу був домінуючим. При цьому підвищення температури виявилось критичним фактором, що модулює встановлені для низькотемпературного впливу ефекти.

Дослідження стану системи антиоксидантного захисту та проявів окисного ураження в тканині травної залози за субхронічного впливу на організм молюска ксенобіотиків у **підрозділі 3.3.** продемонструвало прооксидантний ефект, виражений як зростання рівня утворення продуктів переокисного окиснення ліпідів, окисних модифікацій протеїнів, окисненого глутатіону за впливу всіх досліджуваних факторів окрім дії мінімальної концентрації (40 нМ) Раундапу, що виявляє аантиоксидантний вплив, зокрема на супероксиддисмутазну активність, а при температурі 25° С – систему глутатіону. Обчисленні інтегральні показники свідчать, що за впливу на організм Раундапу та фармацевтичних препаратів поокремо та у сумішах низькомолекулярні тіоли, метаболіонеїни та глутатіон, є головними клітинними антиоксидантами, які визначають зміни антиоксидантного стану у системі.

У **підрозділі 3.4.** описано дослідження токсичності середовища за субхронічного впливу на організм молюска ксенобіотиків за різних температурних режимів. Авторкою доведено, що Раундап викликає цитотоксичний ефект, який посилюється у залежності від зростання його концентрації та теплового режиму, що проявляється як дестабілізація лізосомальних мембран у травній залозі. Авторкою встановлено важливий факт: фармацевтичні препарати ніфедипін та хлорпромазин, на відміну від Раундапу, посилюють стабільність лізосомальних мембран за впливу по окремо та у сумішах (для ніфедипіну). Також встановлено, що вплив 40 нМ Раундапу, ніфедипіну та їх сумішей викликають активацію ключового цинк-залежного ензиму апоптозу каспази- .

Результати впливу хелаторів металів на цинк-депонувальні властивості та систему антиоксидантного захисту у травній залозі *U. tumidus* у експерименті



*ex vivo*, які представлені дисертанткою у **підрозділі 3.5.**, дозволили уточнити механізм хелатуючого впливу Раундапу у організмі молюска, зокрема довели, що Раундап діє опосередковано на акумуляцію цинку у металотіонеїнах, на відміну від модельного цинк-хелатора ТПЕНу. Тут також відзначено, що, Раундап не має аналогічної до ТПЕНу дії на активність цинк-залежного протеїну каспази-3 та стабільність лізосомальних мембран. Разом з тим, прооксидантний ефект Раундапу узгоджується з результатами його впливу у субхронічному експерименті *in vivo*, що свідчить на користь опосередкованого впливу на металотіонеїни через прооксидантні зміни у тіоломі.

У **розділі 4** здобувачка логічно підводить підсумок проведених досліджень. Застосовані сучасні методи математичного аналізу сприяли інтеграції та встановленню логічних взаємозв'язків між визначуваними показниками. Продемонстровано, що серед досліджуваних ефектів Раундапу, його вплив на клітинні низькомолекулярні тіоли був найбільш вираженим та послідовним, що робить ці показники перспективними біомаркерами токсичного впливу Раундапу. Проте низка специфічних реакцій металотіонеїнів, системи антиоксидантного захисту, ензимів апоптозу та функціонального стаун лізосом, спричинених фармацевтичними препаратами, за виключенням стабілізації лізосом, нівелюються за спільного впливу з Раундапом.

Дисертантка формулює вісім висновків, які логічно витікають із представлених результатів досліджень, цілком відображають основний зміст роботи і привертають увагу до основних моментів проведеного дослідження.

**Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертаційному дослідженні.**

Сформульовані положення, висновки та рекомендації ґрунтуються на експериментальних даних, отриманих з дотриманням стандартних вимог до утримання тварин та відбору проб, на достатній кількості повторностей у експерименті і одночасному забезпеченні негативних та позитивних контрольних груп для комплексного впливу досліджуваних чинників. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже, ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

#### **Наукова новизна.**

У дисертаційній роботі встановлено вплив органофосфонатного препарату Раундапу на метал-хелатуючу здатність металотіонеїнів молюска та доведено опосередкованість цього впливу прооксидантним ефектом препарату. Встановлено високу чутливість ступеню металювання металотіонеїнів молюсків до дії Раундапу у мінімальних, фіксованих у довкіллі концентраціях, , що відповідають 1,0 та 0,5 очікуваної концентрації, яка прогнозовано не дає ефекту (PNEC), та його посилення за температури 25°C. Доведено посилення ефекту обох концентрацій Раундапу у комбінації з лікарськими препаратами хлорпромазином чи диклофенаком та ніфедипіном при 18°C та 25°C. Вперше



виявлено, що Раундап модулює властивості а цинк-залежних протеїнів, зокрема каспази-3. Визначено специфічні ознаки впливу фармацевтичних препаратів на стан металотіонеїнів, показники стресу та детоксикації в організмі молюска. Зокрема, виявлено активацію біогенезу лізосом у травній залозі молюска за впливу регуляторів кальцієвих каналів хлорпромазину та ніфедипіну (окремо та у сумішах). Температурний режим виявився критичним фактором, що впливає на акумуляцію металу у складі металотіонеїнів та його розподіл у клітині за впливу ксенобіотиків. Вперше запропоновано модель *ex vivo* для з'ясування впливу Раундапу та, у експерименті з блокатором цинку ТПЕНом доведено опосередковану прооксидантним ефектом хелатуючу дію Раундапу у біологічних системах.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати дисертанткою щодо рівню металювання металотіонеїнів у тканинах молюска можуть бути використані як оціночний критерій стійкості водних екосистем. Напрацьована модель *ex vivo* запропонована для раннього діагностики токсичності суміші ксенобіотиків. Доведено, що за ознакою стабільності лізосомальних мембран реакція молюсків відповідає ефектам, відомим для вищих тварин, що мотивує використання цього модельного організму для вивчення впливу фармацевтичних препаратів.

**Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях.**

Слід відмітити значну кількість публікацій авторки, зокрема у виданнях кваліфікації Q1-Q2. За матеріалами дисертації опубліковано 17 праць, у тому числі 1 патент на корисну модель, 7 статей у фахових виданнях, з яких 3 статті у виданнях з сумарним імпаکت-фактором 13,35, 9 матеріалів і тез доповідей на з'їздах і конференціях.

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

Праця написана змістовно, загалом літературною мовою, стиль викладення матеріалу науковий, думки висловлені логічно та послідовно. Дисертаційне дослідження Хоми В.В. є цілісним, завершеним дослідженням.

**Дискусійні положення й зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.**

1. Насамперед, у назві самої роботи варто було вказати біологічний вид.
2. Чи коректно застосовувати вирази «40 нМ Раундапу» та «80 нМ Раундапу» до засобу, який складається з кількох компонентів? Чи не варто було перераховувати на вміст гліфосату?
3. При обчисленні концентрації металотіонеїнів використані відомості для металотіонеїнів хребетних тварин: дводоменна структура, стехіометрія зв'язування металів. Чи коректна така екстраполяція?
4. Чому для досліду в моделі *ex vivo* обрано іншу концентрацію Раундапу, ніж в моделях *in vivo*?



5. Яка стехіометрія зв'язування металів компонентами Раундапу - - гліфосатом та ТПЕНом, чи коректно порівнювати дію однакових концентрацій Раундапу (гліфосату) та ТПЕНу на зв'язування цинку?

6. Залишилося незрозумілим, чи досліджені біохімічні реакції є специфічними чи неспецифічними до дії досліджуваних речовин.

7. У тексті є певні стилістичні недоліки, перевантаження скороченнями, що утруднює читання. У роботі трапляються технічні огріхи – невідповідність позначень (наприклад СОД та SOD). На с. 36 дублюється посилання на літературні джерела. Відсутні знаки пунктуації у деяких складнопідрядних реченнях. Також простежується калька з англійської мови.

**Проте** вказані зауваження та рекомендації не впливають на високу оцінку та наукову цінність дисертаційного дослідження Віри Хоми.

**Загальний висновок про відповідність роботи встановленим вимогам.**

Дисертаційне дослідження Хоми Віри Вячеславівни «Властивості металотіонеїнів двостулкового моллюска за впливу на організм стресорних чинників хронічної та короткотривалої дії» за своїм змістом, рівнем наукової новизни та характером висновків відповідає спеціальності 091 – Біологія та вимогам наказу Міністерства освіти і науки від 12.01.2017 р. №40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» і затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. №44 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її авторка Хома Віра Вячеславівна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю – 091 Біологія.

**Офіційний опонент:**

доктор біологічних наук,

професор кафедри біохімії та біотехнології

Прикарпатського національного університету

імені Василя Стефаника

«14» листопада 2022 року

Володимир ЛУЦАК

