

До разової спеціалізованої вченої ради ДФ 58.053.037
Тернопільського національного педагогічного
університету імені Володимира Гнатюка
(46027, м. Тернопіль, вул. Максима Кривоноса, 2)

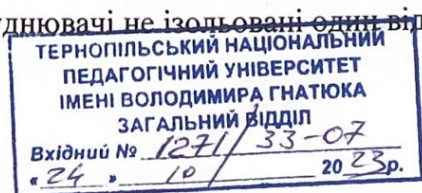
ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук,
професора, провідного наукового співробітника Інституту біохімії
імені О. В. Палладіна Національної академії наук України

Ольги МАТИШЕВСЬКОЇ

на дисертаційну роботу Вікторії МАРТИНЮК
«Біохімічні механізми впливу мікропластику на організм двостулкового
моллюска *Unio tumidus* поокремо та за комбінованої дії»,
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань
09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність обраної теми. На сьогодні є загально визнаним, що інтенсивний синтез багатьох нових класів полімерів ознаменував народження епохи пластику. Більша частина виробленого пластику залишається у навколишньому середовищі, а той, що виробляється щодня, продовжуватиме існувати протягом сотень років. У світовому океані вже накопичилося понад 150 мільйонів тонн пластику і щороку додається близько десяти мільйонів. Проте лише порівняно нещодавно у науковій літературі почали висвітлювати проблему забруднення водного середовища мікропластиком (МП) та його негативного впливу на біоту, переважно морську. Між тим, 70-80% загальної кількості МП потрапляє у морське середовище з прісних водойм. На жаль, інформацію про вміст МП у водоймах України є обмеженою, а даних щодо його акумуляції фільтрувальними видами організмів у прісних водоймах, як і щодо біохімічних наслідків такої акумуляції, вкрай недостатньо. Проблема ускладнюється ще декількома факторами. Забруднювачі не ізольовані один від



одного у водному середовищі, тому можливий комбінований вплив постійно змінюваних мікропластиків та інших сполук, зокрема, поллютантів фармацевтичного походження, що можуть адсорбуватися на гідрофобній поверхні МП (так званий ефект троянського коня). Окрім того, нез'ясованим залишається питання про те, якою мірою вплив забруднювачів залежить від температурного режиму як змінюваного екологічного фактору, а також від вже сформованого адаптаційного потенціалу організмів у забрудненому біотопі. Чи є стан адаптивної системи хронічним чи він коливається залежно від рівня споживання мікропластику? Скільки частинок мікропластику потрібно накопичити, щоб почалися негативні біохімічні наслідки? Якими є наслідки комбінованої дії МП та поллютантів іншої природи? Ці питання є причиною для занепокоєння, а відповіді все ще становлять прогалину у знаннях наукової спільноти.

На підставі цього можна стверджувати, що тема дисертаційної роботи Вікторії МАРТИНЮК «Біохімічні механізми впливу мікропластику на організм двостулкового моллюска *Unio tumidus* поокремо та за комбінованої дії», що присвячена оцінці впливу частинок мікропластика на прісноводного моллюска у екологічно реальній моделі, є актуальною та має важливе наукове значення та практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Робота виконувалась у межах держбюджетних тем МОН України М/70-2021 (номер державної реєстрації 0121U113511) «Розробка набору біопроб – біомаркерів для оцінки впливу фармацевтичних препаратів на водні екосистеми». М/84-2021 (номер державної реєстрації № 0121U113543); М/13-2022 (номер державної реєстрації № 0122U002428) «Імунологічне та біохімічне порівняння резистентності інвазивних і природних двостулкових моллюсків до впливу викликів довкілля».

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Запорукою обґрунтованості сформульованих у дисертації положень і висновків є високий методичний

рівень здійсненого дослідження. Цілком виправданим є вибір перлівниці *Unio tumidus* як об'єкта дослідження, оскільки цей гідробіонт відрізняється доступністю відбору, широкою поширеністю, прикріпленим способом життя та фільтраційним типом харчування. Для досягнення мети логічною є оцінка таких показників, як активність антиоксидантних ензимів, співвідношення NAD^+/NADH , вміст і активність металотіонеїнів, які спільно з глутатіоном підтримують редокс-потенціал та залучені до обміну металів у клітинах, а також показників апоптозу та лізосомального шляху ушкодження клітин. У роботі використано достатній спектр сучасних біохімічних та загальнобіологічних методів (електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі, гель-розподільна хроматографія на Сефадексі G-50, спектрофотометричні методи визначення активності ензимів, світлова та флуоресцентна мікроскопія), а також методів статистичного, дискримінаційного та двофакторного дисперсійного аналізу. Цей перелік засвідчує достатній рівень оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності.

Структура дисертації. Дисертація Вікторії МАРТИНЮК загальним обсягом 158 сторінок комп'ютерного набору, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, переліку використаних джерел, який містить 263 джерела (серед яких значна частина статей останніх 5-ти років). Робота ілюстрована 30 рисунками та 10 таблицями.

В огляді літератури розглянуто сучасний стан забруднення навколишнього середовища пластиком та такими поширеними фармацевтичними препаратами, як ібупрофен та саліноміцин, та їх вплив на водні організми. У розділі 3 **Експериментальні результати та їх обговорення** представлено такі компоненти дослідження: 3.1 - накопичення мікропластику в організмі двостулкового молюска за експериментальних та польових умов існування; 3.2 - характеристика металотіонеїнів *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику різного розміру та фармацевтичних препаратів; 3.3 - дослідження реакції окисного/редуктивного стресу у травній залозі молюсків *U. tumidus* за

впливу на організм мікропластику різного розміру та фармацевтичних препаратів; 3.4 -оцінка токсичності впливу на організм *U. tumidus* мікропластику та фармацевтичних препаратів окремо та у комбінаціях за ознаками апоптозу та лізосомальної функціональності. Розділ 4 присвячене **аналізу та та узагальненню результатів** з акцентом на обґрунтування мінімального набору біомаркерів екотоксичності мікропластику окремо та у комбінованій експозиції.

Новизна представлених експериментальних результатів дослідження.

Серед отриманих експериментальних результатів відзначимо найбільш вагомі та отримані вперше. Вперше доведено, що перлівниця акумулює з водного середовища мікропластик розміром 0,1-0,5 мм за його концентрації мг/л упродовж 14 діб інкубації з максимальним накопиченням у м'яких тканинах на 8-10 добу. Виокремлено адаптаційні реакції, що є спільними у відповіді на дію МП переважної більшості експериментальних груп – зниження у травній залозі молюска вмісту NAD^+ та підвищення вмісту $NADH$, що свідчить про пригнічення аеробних процесів та індукцію редокс-стресу; посилення активності катепсину Д у цитозолі клітин як показника лізосомального шляху елімінації ушкоджених клітин; дисбаланс вмісту металотіонеїнів та їх депонувальної ємності щодо цинку та купруму. Виявлено, що за дії МП розміром 2мкм у м'яких тканинах молюска виявляються ознаки не лише виходу катепсину Д з лізосом, але й індукції механізму загибелі клітин через апоптоз, що вказує на більший токсичний ефект МП малого розміру. Продемонстровано антиоксидантну активність ібупрофену у двох популяціях та його здатність пригнічувати активність каспази-3 у тканині молюсків з екологічно чистого водного середовища, яка втрачається у молюсків із забрудненого середовища. Показано, що у разі приєднання теплового фактору ($25^{\circ}C$) до комбінованої дії МР (2мкм) та саліноміцину на популяцію молюсків із забрудненого середовища адаптивні реакції нівелюються, що свідчить про перевищення сформованого адаптивного потенціалу організму.

Зроблені у роботі висновки підкреслюють необхідність впровадження комплексного підходу, що передбачає мультифакторний аналіз взаємодії складників хімічного «коктейлю» з врахуванням особливостей температурного режиму при оцінці екологічних ризиків наявності мікропластику у водному середовищі. За результатами дослідження запропоновано біомаркери для оцінки екотоксичності водного середовища - вміст мікропластику у м'яких тканинах двостулкового моллюска; зменшення співвідношень $NAD^+/NADH$ та Zn/Cu для оцінки адаптаційного потенціалу моллюсків.

Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць - 5 статей у фахових виданнях, з яких 3 у виданнях з сумарним імпаکت-фактором 11,66, $h=6$ згідно даних Scopus (Scopus Author ID: 57210322204), 8 тез доповідей на з'їздах і конференціях. Результати дослідження підтверджено двома патентами на корисну модель.

Загальні зауваження і питання.

- 1) Як пояснити вибір концентрації досліджуваних сполук, якщо врахувати що обраний вміст забруднювачів перевищує відомий з літератури екологічно релевантний – ПЕТ 850 часток/л проти 0,2- 25/л), Полістиролу -240 мільйонів /л проти 6-200/л, а також фармацевтиків, концентрація яких на декілька порядків перевищує ту, що трапляється у забруднених водоймах.
- 2) У *Таблиці 3.1.2* представлено результати поглинання МП моллюсками, відібраними з чистого чи з забрудненого водного середовища? Чи відрізнявся ступінь поглинання МП моллюсками з цих різних середовищ і якщо так, то як саме? У цій таблиці є колонка «Кількість частинок в організмі» - в усьому організмі (тоді як це оцінювали) чи у травній залозі?
- 3) Чи змінювався розмір МП у середовищі утримання моллюсків та розмір накопичених у травній залозі МП упродовж 14 днів експозиції, чи лише їх кількість? Що може бути причиною зменшення кількості накопичених МП на 14-й день експозиції?

- 4) Окрім впливу на адаптаційний потенціал, чи не проявляються ознаки цитотоксичності досліджуваних сполук і чи не потрібно для з'ясування цього провести гістологічний аналіз тканини травної залози?
- 5) При інтерпретації отриманих даних щодо підвищеної активності катепсину Д у необробленому тритоном гомогенаті авторка використовує термін аутофагія. Скоріше продемонстровано факт підвищеної проникності мембрани лізосом, або, можливо, посилення ролі катепсину як травного ензиму. Значне ушкодження лізосомальної мембрани може призводити до лізосомального шляху загибелі клітин, але у роботі це не доведено. Щодо аутофагії, то цей механізм реалізується за відсутності ознак апоптозу.
- 6) Відомо, що визначальною і першочерговою ланкою біотрансформації ксенобіотиків є система цитохрому P450, присутня і у організмі молюсків. Чи не варто було оцінити її активність за дії полютантів і чи є відповідні дані у літературі?
- 7) Висновки є дещо перенавантаженими (схожі на перелік отриманих результатів). Залишаються недостатньо чітко сформульованими узагальнення та відповіді на питання: які ж відмінності у біохімічних реакціях адаптованих до забруднення та неадаптованих молюсків на дію МП?; чи можна говорити про цитотоксичний ефект МП чи лише про індукцію адаптації?; чи посилюється дія фармацевтиків за сумісної дії з МП (векторний ефект, на небезпечності якого наголошують)?

Питання до методичної частини:

- Як саме здійснювали підрахунок кількості накопичених МП?
- Як оцінювали інтенсивність поглинання смуг на електрофореграмах?.
- Нанономолі чого вказано в одиницях активності катепсину Д?

Зауваження щодо використаних термінів.

Редукційний стрес - правильно редокс-стрес (або окисно-відновний), тому що дослівно reduction stress – це зниження стресу. Є оксидативний (окисний) стрес – це надмірне утворення АФК, і окисно-відновний (редокс стрес), коли зачіпається статус відновлювальних елементів.

Приклади невдалих виразів — вільна активність катепсину, апоптозна активність, фільтруючий (фільтрувальний) способу харчування, пошкоджуючий (пошкоджувальний) вплив.

Ці зауваження не знижують загального високого рівня виконання поставленого наукового завдання та значення представленої дисертаційної роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Вікторії МАРТИНЮК «Біохімічні механізми впливу мікропластику на організм двостулкового моллюска *Unio tumidus* поокремо та за комбінованої дії» за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем, практичним значенням 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 здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
провідний науковий співробітник Інституту біохімії
імені О. В. Палладіна
Національної академії наук України



Ольга МАТИШЕВСЬКА

Підпис <i>Ольги Матишевської</i>
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"23" вересня 2023 р. <i>AS</i>