

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **ВОЙЧУКА СЕРГІЯ ІВАНОВИЧА** “Механізми дії стресових факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів”, подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія (091 – біологія)

Актуальність роботи.

Будь-які організми постійно перебувають під впливом несприятливих факторів оточуючого середовища та зазнають впливу стресових чинників абіотичної та біотичної природи, що призводить до порушення рівноваги між різними метаболічними реакціями, які протікають у клітині. Природа структурних, біохімічних і генетичних змін, які спостерігаються при дії різних факторів є подібною для всіх організмів. Універсальність біологічної відповіді полягає в тому, що при дії різноманітних чинників спостерігається певна послідовність реакцій та індукується подібний спектр захисних реакцій і систем.

З'ясуванню впливу стресових чинників та відповіді клітини на їх дію, зокрема ролі різних клітинних структур (вакуолі, цитоплазматичної мембрани, цитоскелету та мітохондрій) у формуванні біологічної відповіді на дію різноманітних стресів, присвячені численні дослідження (понад 1 млн результатів дав пошук у Google). У переважній більшості вони спрямовані на вивчення механізмів впливу та захисту від дії осмотичного шоку, пероксидного, етанольного, кислотного, термічного та інших видів стресів. В останні роки особливу увагу приділяють неіонізуючому електромагнітному випромінюванню антропогенного походження, механізм біологічної дії якого залишається невідомим, так само як і характер сумісної дії його з іншими чинниками стресу. Ці знання необхідні не тільки для розуміння фундаментальних основ співіснування живих організмів, а й для розробки стратегії та методів підвищення стійкості організму до стресових умов, що є важливим для запобігання та лікування низки захворювань, збереження біорізноманіття, контролю біотехнологічних виробництв, тощо.

Саме тому дисертаційна робота Войчука С.І., присвячена вивченню ролі основних структурних компонентів поверхневих шарів клітини у формуванні стійкості мікроорганізмів до дії факторів стресу, є актуальною.

Метою роботи було визначити фізико-хімічні, структурні та функціональні особливості будови клітинної стінки, позаклітинного матриксу і цитоплазматичної мембрани за дії факторів стресу та дослідити механізми регуляції біосинтезу низки компонентів цих поверхневих структур

Наукова новизна роботи. Проведені дисертантом дослідження розширюють та поглиблюють уявлення про механізми біологічної дії різних стресів, формування стійкості клітин дріжджів до дії стресів хімічної природи та неіонізуючого випромінювання радіочастотного діапазону, зокрема:

- вперше теоретично обґрунтовано і експериментально підтверджено здатність неіонізуючого електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону змінювати процеси синтезу компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани дріжджів і впливати на чутливість цих мікроорганізмів до дії фізико-хімічних чинників стресу. Доведено, що ці структури залучені у формування клітинної відповіді на різноманітні стресові чинники.
- Виявлено, що неіонізуюче радіочастотне електромагнітне випромінювання може стимулювати процеси геномної мінливості, мутагенезу та апоптозу, а дія цього випромінювання реалізується через утворення активних форм кисню і вільних радикалів, зміну рН, тонічності, зміну компонентів поверхневих структур клітини. Показано здатність неіонізуючого радіочастотного електромагнітного випромінювання змінювати рівень експресії генів, які кодують ферменти синтезу жирних кислот, білків, стеролів та убіквітинового комплексу.
- Отримано дані, які свідчать про те, що загальна стійкість до стресів обумовлена вмістом N-ацетилглюкозаміну в клітинній стінці та рівнем експресії гену *RHO84*, який кодує білок трансмембранного каналу транспорту фосфату. Чинниками загальної стійкості до стресів можуть бути також попередники шляху синтезу ергостеролу.
- Встановлено, що важливу роль у формуванні стійкості до стресу відіграють поліфосфатази, які залучені до процесів біосинтезу компонентів клітинної стінки, адгезії клітин до абіотичних субстратів, до міжклітинної взаємодії і формування стійкості до антибіотиків та до формування явища адаптивної відповіді. Запропоновано механізм формування адаптивної відповіді клітин дріжджів за дії електромагнітного випромінювання високої частоти за участю поліфосфатаз і ферментів дегідрогеназного комплексу.
- Виявлено, що радіочастотне випромінювання може зменшувати ефективність хімічних чинників шляхом активації процесів адаптивної відповіді. За дії декількох чинників відповідь на стрес визначається фактором з найбільш виразним цитотоксичним чи генотоксичним потенціалом.

Практичне значення одержаних результатів.

З'ясування тонко регульованих механізмів, які дозволяють організму адаптуватись до стресу, викликаного несприятливими умовами, дією природних та штучних чинників, є важливим для попередження розвитку фізіологічних порушень та виникнення низки захворювань. Опрацьовані та детально описані

методики досліджень впливу стресових чинників на використанні модельні об'єкти можуть і повинні бути застосовані при вивченні впливу інших факторів стресу. Зокрема методика визначення цукрів в складі клітинної стінки і позаклітинного матриксу методом мічених лектинів, новий підхід до виділення ДНК/РНК з клітин дріжджів, швидкої кількісної оцінки фізіологічного стану популяцій культур клітин за фотометричними показниками при фарбуванні акридиновим помаранчевим. Сконструйовані дефектні за поліфосфатазами штами *S. cerevisiae* придатні для вивчення біологічної ролі цих ферментів.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень.

Радіочастотне електромагнітне випромінювання може бути застосоване для надання стійкості мікроорганізмам до цито- і генотоксичних чинників, що використовуються в агро- і біотехнологічній галузях, в галузі охорони довкілля, тощо. Клітин дріжджів можуть бути використані як сенсорні елементи для детектування біологічної дії неіонізуючого електромагнітного випромінювання.

Особистий внесок здобувача. Висвітлені в роботі результати отримані за безпосередньої участі здобувача. Співучасть співробітників Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, Інституту фармакології та токсикології АМН України, Інституту фізики напівпровідників ім. В. С. Лашкарьова, Інституту громадського здоров'я ім. О. М. Марзоева та Інституту наук про оточуюче середовище Ягелонського університету (м. Краків, Польща) зазначена в дисертації та відображена у спільних публікаціях.

Публікації та апробація результатів досліджень. Результати досліджень достатньо повно висвітлені в публікаціях. За темою дисертаційної роботи опубліковано 83 наукові праці, з них 23 включені в міжнародні бази даних. Про ознайомлення наукової спільноти з результатами досліджень свідчать численні виступи на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях та з'їздах.

За змістом, обсягом та структурою робота Войчука С.І. відповідає вимогам, які ставляться до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук. Структура дисертаційної роботи має традиційний характер.

Огляд літератури за змістом відповідає напрямку проведених досліджень, написаний чітко і послідовно. У ньому подано сучасну інформацію про вплив різноманітних чинників стресу на живі організми, формування стійкості до стресів різної природи, узагальнено відомості про біологічну дію радіочастотного електромагнітного випромінювання на живі організми. Проведений аналіз сучасного стану досліджень механізмів дії окремих чинників стресу та їх взаємодії дозволив дисертанту обґрунтувати важливість і необхідність проведення запланованих досліджень.

Автором проведена величезна за об'ємом експериментальна робота, яка складається з декількох частин: 1- вплив стресових факторів на морфолого-структурні та фізіолого-біохімічні особливості відповіді клітин мікроорганізмів

на дію стресових факторів; 2 – зміни компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу і мембран клітин дріжджів за дії факторів стресу; 3 – вплив стресових факторів на рівень експресії генів-маркерів стресової дії; 4 – вплив факторів стресу на чутливість до антибіотиків, адгезію клітин дріжджів та їх взаємодію з клітинами ссавців.

Грунтуючись на отриманих результатах, автором запропоновано декілька узагальнюючих схем, зокрема, дії радіочастотного електромагнітного випромінювання на клітини живих організмів через утворення активних форм кисню, активації процесів адаптивної відповіді і збільшення стійкості до зовнішніх чинників стресу, схему компонентів поверхневих шарів клітини і біохімічних процесів, які обумовлюють стійкість дріжджів до дії факторів стресу.

Робота виконана на високому науково-методичному рівні із застосуванням широкого спектру мікробіологічних, біохімічних, фізіологічних, генетичних фізико-хімічних методів, а також методів математичної статистики. Використані методичні підходи адекватні поставленим завданням. Достатньо перелічити лише деякі з них: газова хроматографія, мас-спектрометрія, ПЛР в реальному часі, люмінісцентна, скануюча та трансмісійна електронна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія та інші. Особливо варто відзначити, що дисертантом для планування і аналізу отриманих даних застосовано статистичний потенціал з використанням параметричної і непараметричної статистики, кореляційного і кластерного аналізів, аналізу багатфакторних експериментів, тощо.

Застосування широкого спектру підходів для досягнення мети та глибокий аналіз даних дозволяють ствердити, що наведені результати є достовірними, основні наукові положення і висновки обґрунтовані.

Робота добре ілюстрована (21 таблиця, 90 рисунків, 18 додатків).

Зауваження, питання для обговорення та побажання.

1. Аналіз морфологічних і ультраструктурних змін, які мають місце в клітинах за дії хімічних і фізичних факторів стресу проводили із використанням бактерій *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, представників роду *Clostridium* і *Photobacterium phosphoreum*, а також дріжджів видів *Saccharomyces cerevisiae* і *Candida albicans*. Чому обрано саме ці, а не інші види мікроорганізмів?
2. Завдання 6 сформульовано "Встановити зв'язок між змінами в будові клітинної стінки, позаклітинного матриксу і цитоплазматичної мембрани та процесами на клітинному рівні (адгезія...). Це завдання могло бути невиконаним, оскільки такого зв'язку може й не бути.
3. Дослідження впливу радіочастотного електромагнітного випромінювання, зокрема на стан цитоплазматичної мембрани, проводились на різних мікроорганізмах. Чи відрізняються отримані результати від опублікованих раніше, що нового виявлено?

4. Чи підтвердили отримані Вами дані твердження «Взаємодія ЕМВ з іншими факторами, такими як іонізуюче і рентгенівське випромінювання, різними хімічними агентами має синергічну дію (стр.61)?
5. Робота містить підрозділ "Вплив фізичних природних факторів на фізіолого-біохімічні особливості клітин дріжджів", який займає 7 стр. тексту, однак висвітлені в ньому цікаві результати не відображені у висновках і в обговоренні результатів. Це зауваження стосується і розділу 6.2 "Вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на адгезивні властивості клітин дріжджів", який займає 16 сторінок тексту, однак майже не обговорюється при узагальненні отриманих результатів.
6. Вплив різних видів стресу на білки клітинної стінки дріжджів, вивчали на транскрипційному рівні і було знайдено що у деяких випадках рівень експресії досліджуваних генів не корелював зі стійкістю клітин до чинників стресу. Однак це ще не свідчить про те, що білки не залучені у формування стійкості до дії різних стресових факторів. Відомо, що характер відповіді на дію стресових чинників залежить не тільки від рівня транскрипції окремих генів, а й від тривалості життя відповідних іРНК, від зміни балансу в трансляційному апараті дріжджів.
7. Що мається на увазі у фразі «ефективність дії опромінення залежить від біологічних властивостей живих організмів» (висновок 2).
8. Як пояснити, що клітини з дефектом однієї екзополіфосфатази (PPX1) були на порядок чутливішими до дії пероксиду водню, але обидвох досліджуваних поліфосфатаз (PPX1 і PPN1), які виконують однакові функції, - ні?
9. Чи отримано на інших мікроорганізмах докази існування зв'язку між дією радіочастотного електромагнітного випромінювання і резистентністю до антибіотиків?
10. Наскільки встановлені для дріжджів закономірності впливу різних видів стресів та адаптивної відповіді можуть бути перенесені на організм тварин і людини?
11. У роботі досить часто зустрічаються невдалі вислови та граматичні помилки. Наприклад: збільшення концентрації стресу, стрес-індукуємі гени, клітини здатні до поділу (дріжджі *S. cerevisiae* розмножуються брунькуванням, а не поділом); новітні внутрішньоклітинні сполуки; активність ферментів каталаз і т. п.

Більшість з перелічених запитань та зауважень мають дискусійний характер і не зменшують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи.

Висновок.

1. Дисертаційна робота Войчука С.І. є завершеною науковою працею, в якій встановлено основні структурні компоненти поверхневих шарів клітини, які забезпечують стійкість до дії чинників біотичної та абіотичної природи та встановлено механізми біологічної дії неіонізуючого випромінювання радіочастотного діапазону.

Отримані результати поглиблюють уявлення про механізми відповіді клітин на дію стресу, викликаного різними чинниками.

2. Автореферат повністю відображає зміст дисертації.
За своєю актуальністю, високим методичним рівнем проведених фундаментальних досліджень, науковою новизною отриманих результатів, обґрунтованістю сформульованих наукових положень, достовірністю отриманих результатів та практичною цінністю дисертаційна робота **Войчука Сергія Івановича** відповідає вимогам пункту 11, 12 Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р., № 567 (зі змінами), а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія

Пров. наук. співробітник відділу
молекулярної генетики і біотехнології
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук, професор



Федорович Д.В.

22 квітня 2021 року

Підпис Федорович Д.В. засвідчую
Вчений секретар, к.б.н.



Барська М.Л.