

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Лозінського Олександра Васильовича
«Мітохондріальна складова системи антиоксидантного захисту
***Drosophila melanogaster* та оцінка її ефективності за фізіологічними**
критеріями», подану на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Проблема окисного стресу залишається однією з найбільш актуальних у дослідженні молекулярних реакцій тваринного організму на вплив пошкоджуючих чинників. Параметри системи антиоксидантного захисту повсюдно використовуються у доказовій базі експериментальних робіт, що частково пояснюється позірною простотою та малою витратністю експерименту, а також удаваною легкістю оцінки його результатів за вмістом продуктів окисного ушкодження. Проте уявлення про діапазон відповіді цієї системи, взаємозв'язок між її окремими ланками, місце у реакції організму залежно від його стану, рівню організації та природи діючого чинника, а також про критерії оцінки ефективності антиоксидантного захисту залишаються далекими від цілісності. Велика увага у дослідженнях, що виконуються науковою школою проф. В.І. Луцака, приділяється філогенетичним особливостям формування системи антиоксидантного захисту тварин (Lushchak, 2011, 2012, 2015). Опубліковані ним статті належать до найбільш затребуваних та цитованих публікацій у виданнях «Aquatic toxicology», «Comparative biochemistry and physiology». Успішність використаних ним моделей і підходів демонструється також на прикладі тематики 9-го Міжнародного конгресу порівняльної фізіології та біохімії (ICCPB 2015, Краків, Польща, 2015) за участю проф. В.І. Луцака. Представлена дисертація являє собою логічний розвиток цих праць. Взаємозв'язок між дією протонатора 2,4-динітрофенолу та прооксидантними змінами, зумовленими надходженням модельних прооксидантів, зокрема сполук заліза та індукторів оксиду нітрогену NO, не досліджений.

Зв'язок з державними і галузевими програмами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника та є частиною наукової тематики кафедри “Вивчення механізмів пристосування організмів до несприятливих умов середовища з метою розробки методів підвищення їх адаптаційного потенціалу”, номер держреєстрації – 0107U001367.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у розвитку оригінального підходу до вивчення проблеми взаємозв'язку між фізіологічними характеристиками організму та інтенсивністю окисного стресу та демонстрації ефективності його регуляції за допомогою відомого протонатора динітрофенолу. Дисертантом отримано великий спектр результатів стосовно стану чинників системи антиоксидантного захисту та підтримання відновного балансу у організмі плодової мухи за впливу трьох прооксидантних чинників на ранніх стадіях розвитку організму, що

становить науковий інтерес для розуміння молекулярних основ адаптації організму в процесі онтогенезу. Доведено ефективність використання протонофору динітрофенолу для пригнічення прооксидантних проявів дії індукторів активних форм кисню та азоту.

Практичне значення і перспектива роботи зумовлені доведенням ефективності корекції прооксидантних процесів шляхом регуляції мітохондіальної складової тканинного дихання. Без сумніву, поява нових даних про біологічну дію динітрофенолу буде сприяти генерації нової хвилі інтересу до практичного використання цього роз'єднувача дихання і фосфорилування. Плодова муха *Drosophila melanogaster* за останні декади стала визнаним модельним організмом для дослідження захворювань людини. Її навіть називають «маленькою персоною з крилами», оскільки 60 % генів, що визначають захворювання людини, має гомологи у плодовій мухи (D. Schneider, 2000). Відтак, існує перспектива екстраполяції отриманих результатів на модель корекції відповіді людини на окисний стрес.

Структура роботи

Дисертаційна робота О.В. Лозінського викладена на 119 сторінках комп'ютерного набору та побудована за традиційною схемою. Вона складається зі вступу (стор. 6–10), аналітичного огляду літератури (стор. 11–29), матеріалів і методів дослідження (стор. 30–40), розділу, присвяченого результатам власних досліджень, їх аналізу і узагальненню (стор. 56–97), завершується шістьма висновками та списком використаної літератури (202 найменування). Співвідношення та обсяг окремих частин роботи відповідають рекомендаціям ВАК України. Результати роботи проілюстровані 30-ма рисунками та 2 таблицями.

У **«Вступі»** автор обґрунтовує актуальність власного дослідження провідною роллю мітохондрій у генерації радикалів та висловлює гіпотезу про взаємозв'язок між інтенсивністю окиснення у дихальному ланцюгу мітохондрій та рівнем генерації активних форм кисню та азоту. Сформульовані завдання повністю відповідають поставленій меті і розкривають її. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

У Огляді літератури (11–24 с.) подано загальну інформацію про складові системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження, а також подано характеристику використаних експериментальних чинників, що є джерелами NO. Слід відзначити як важливий для дискусії підрозділ 1.2.2, у якому обґрунтовано механізми забезпечення відновного потенціалу у клітинах. Проте незрозуміло, чому три взаємопов'язані системи: NADP-залежна ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}+\text{H}^+$), глутатіон-залежна (GSH/GSSG) і тіоредоксин-залежна ($\text{TrxSS}/\text{Trx}(\text{SH})_2$) визначаються лише як «термодинамічно залежні», а система $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ не згадується взагалі. Використовується досить часто стиль «може бути», замість конкретної інформації, фактологічно обґрунтованої. Підрозділ 1.6. розкриває механізми біологічної дії 2,4-динітрофенолу як протонофору та побудований на використанні джерел літератури останніх років. Проте у Огляді не

диференціюються цитоплазматичні та мітохондріальні чинники підтримання антиоксидантного та відновного балансу, що було би бажано в анонсованій тематиці.

Розділ «*Матеріали та методи досліджень*» засвідчує, що дисертантом використано коректні умови експерименту та застосовано широкий спектр методів аналізу функціональної активності системи антиоксидантного захисту, зокрема активностей великого набору ензимів антиоксидантного захисту, а також продуктів окисного ураження протеїнів та антиоксидантів (сечова кислота, високо- та низькомолекулярні тіолові сполуки), що дозволяє реалізувати поставлені задачі.

Розділ *Результати досліджень та їх обговорення* складається з трьох підрозділів, у яких спочатку розглядається вплив модельних прооксидантів (нітропрусиду та S-нітрозоглютатіону, підрозділи 3.1 та 3.2), а після цього (підрозділ 3.3) – вплив нітропрусиду та ще одного модельного чинника – фероціаніду калію окремо та спільно із протонофором 2,4-динітрофенолом. На нашу думку, відокремлення інформації про вплив кожного з цих чинників на спільні молекулярні мішені ускладнює сприйняття матеріалу, зокрема порівняння їх ефектів. Було б доречніше звести у спільні змістові блоки вплив всіх вивчених чинників на кожену групу досліджуваних показників, скажімо, ензимну активність антиоксидантного захисту, маркери окисного ураження, тощо, поокремо та спільно із динітрофенолом. Адже для впливу нітропрусиду, S-нітрозоглютатіону та фероціаніду калію отримано результати, які свідчать про подібний наслідок дії за більшістю ознак, а додавання 2,4-динітрофенолу, призводило до нейтралізації цих впливів у кожному випадку. Разом з тим, розгляд поокремо дії кожного чинника було проведено з використанням двох-трьох ліній мух, самців та самок поокремо, що також дозволило зробити важливі узагальненні стосовно умов, які модулюють дію кожного чинника на *D. melanogaster*.

У підрозділі 3.1. **Вплив нітропрусиду натрію на розвиток та стан антиоксидантної системи *Drosophila melanogaster*** доведено, що нітропрусид викликає затримку у розвитку мух, зменшення кількості спожитої їжі, та встановлено діючі концентрації цього чинника. Визначено, що додавання до середовища нітропрусиду призводить до зростання рівня заліза та нітритів як у середовищі, так і, особливо у організмі мух, що свідчить про частковий розпад реагенту ще у середовищі інкубації. Дисертант припускає, що накопичення заліза є ключовим фактором, який спричинює швидше старіння та зменшує життєздатність личинок мухи, а також, ґрунтуючись на відомостях про прооксидантну роль заліза, – що цей зв'язок опосередкований генерацією радикальних процесів під впливом заліза як Фентон-металу. Прооксидантна дія середовища була оцінена, зокрема, за сумарною аконітазною активністю на підставі того, що залізо-сірковий кластер у активному центрі ензиму особливо чутливий до впливу оксидантів. В результаті доведено зменшення цієї активності, особливо у самців мух лінії w^{III} у кореляції з кількістю мух, які вилупились із отриманих личинок. Проте, на нашу думку, автор дещо спрощує уявлення про взаємозв'язок

аконітазної активності та концентрації заліза. Зокрема, цитозольна аконітаза (iron regulatory protein 1 IRP1 (або iron response element-binding protein 1 IREP1) активна лише за досить високих концентрацій заліза (II). Як цитоплазматична, так і мітохондріальна форми інактивуються супероксиданіоном із генерацією гідроксилрадикалу, що власне і може бути діючим чинником у даному випадку, проте цей взаємозв'язок не розглядався.

Дисертант відзначає також спектр порушень антиоксидантно-прооксидантного балансу (зростання рівню окисних модифікацій протеїнів, розбалансування активностей загальної СОД та каталази (із активацією СОД), негативний ефект якого є очевидним, виходячи із змін фізіологічних критеріїв. Разом з тим, активності глутатіон-S-трансферази, тіоредоксинредуктази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази за дії НПН зростають, проте ці цікаві результати не інтерпретуються.

Розглядаючи вплив S-нітрозоглутатіону на розвиток та стан антиоксидантної системи *Drosophila melanogaster* (Розділ 3.2), дисертант зазначає лінійне збільшення часу, за якого залялькувалися 50% личинок обох ліній мух з підвищенням концентрації стресора, а також збільшення споживання їжі, що є протилежною реакцією до відповіді на дію нітропрусида. Ці фізіологічні реакції тлумачаться, виходячи із уявлень про генерацію оксиду нітрогену (II) у випадку нітрозоглутатіону, тоді як нітропрусид розглядається як джерело іонів заліза, що, на думку автора, викликає протилежні реакції на рівні енергозабезпечення. На нашу думку, присутні у підрозділі 3.2 об'ємні спекулятивні викладки є зайвими, тим більше у роботі, присвяченій конкретній проблемі окисного стресу (с. 57-58). Природу безпосереднього діючого чинника доводиться шляхом визначення концентрації нітриту, що зростає, як у середовищі, так і у личинках мух. Разом з тим, за біохімічними критеріями, відповідь на дію нітрозоглутатіону та нітропрусида подібна. За впливу нітрозоглутатіону було встановлено зміни рівня окисних модифікацій протеїнів (зростання), розбалансування СОД/КАТ активностей, активація глутатіон-S-трансферази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (як і у випадку дії нітропрусида), та ізоцитратдегідрогенази (відтак розбалансування із активністю аконітази), проте відсутність впливу на активність тіоредоксинредуктази були відзначені. Відтак, дія обох досліджених чинників на біохімічні показники була подібна.

- У підрозділі 3.3. поєднано інформацію про вплив 2,4-динітрофенолу (ДНФ) та нітропрусида, дослідженого у новій дослідній групі, а також фероціаніду калію на розвиток та стан антиоксидантної системи *D. melanogaster*. З використанням як модельних тварин самок двох ліній дрозофіли показано, що нітропрусид та фероціанід за дії поокремо, або у сумішах з ДНФ, впливали на виживання личинок та на висоту заляльковування, що узгоджується і з результатами, представленими у підрозділах 3.1 та 3.2 (однотипні зміни за впливу всіх трьох чинників), проте ДНФ у сумішах зменшує цей вплив. Дисертант справедливо зазначає, що самки *D. melanogaster* стійкіші до дії стресових чинників, таких як

голодування, висока температура і дія ксенобіотиків, проте не використовує результати власного досвіду, висвітлені у підрозділах 3.1 та 3.2. При цьому, що важливо, сам по собі ДНФ не викликав негативних змін фізіологічних показників. Так, споживання ДНФ разом з нітропрусидом не призводило до зниження активності аконітази, змін у рівні карбонільних похідних протеїнів на відміну від нітропрусиду, що показано тут і у підрозділі 3.1. Цікаво, що ДНФ активує каталазу на відміну від всіх інших чинників та не активує СОД (Рис. 3.25), що повинно стимулювати більше ретельне дослідження впливу ДНФ, а не лише як протонифору у мітохондріальному редокс-ланцюгу.

У рубриці «Аналіз і узагальнення результатів» (с 88) автор констатує отримані результати та зазначає, що прооксидантну дію можуть здійснювати як безпосередньо досліджувані чинники, так і продукти їх розпаду у водному середовищі та організмі. Інформація про часткову їх деградацію з вивільненням іонів заліза та сполук нітрогену (за збільшенням рівню нітрит-аніону) власне отримано і у дисертації. Пропонується, що аконітазна активність та параметри розвитку мух, можуть бути надійними індикаторами токсичності, викликані модельними чинниками генерації оксидативного стресу. У цьому підрозділі подається схема впливу ДНФ на прооксидантні процеси на підставі ретельного аналізу даних літератури про вплив ДНФ на генерацію вільних радикалів у редокс-ланцюгу мітохондрій

Відтак, отримані дисертантом результати однозначно указують на те, що нітропрусид, S-нітрозоглутатіон та фериціанід становлять прооксидантні чинники для організму дрозофіли, що позначається негативно на критеріях індивідуального розвитку організму. ДНФ ефективно пригнічує ці ознаки за поєданого впливу з нітропрусидом та фериціанідом.

Автор формулює шість **висновків**, які відображають сутність отриманих результатів.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій.

Сформульовані положення, висновки та рекомендації ґрунтуються на експериментальних даних, отриманих з дотриманням стандартних вимог до відбору проб, на достатній кількості повторностей в експерименті і одночасному проведенні вимірів в контрольній групі та групі, яка піддавалась дії досліджуваного чинника. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже, ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

Недоліки по змісту і оформленню:

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є ряд питань дискусійного характеру, рекомендацій та зауважень до стилю і оформлення.

1. Доказова база дисертації ґрунтується на даних літератури про прооксидантний механізм впливу нітропрусиду, нітрозоглутатіону, фериціаніду та про дію ДНФ як роз'єднувача, а текст насичений припущеннями автора у стилі «ймовірно», «можна припустити», тощо. Проте дисертант не визначав безпосередньо вмісту оксирадикалів, окисненого глутатіону та, зрештою, і відновленого глутатіону ензимним методом, не

диференціював активність мітохондріальних та цитоплазматичних форм СОД та аконітази, що би значно посилило та спростило аргументацію висновків.

2. Нечітко структуровано матеріал: чому вплив фериціаніду не розглядається у окремому підрозділі, аналогічно до впливу нітропрусиду та нітрозоглутатіону?

3. На с 77 подано дані про загальний вміст кальцію в організмі комах, які коментуються із використанням прикладів дослідження розподілу внутрішньоклітинного кальцію, що є некоректним прийомом у даному контексті.

4. С 83 - не можна погодитись, що глутатіон (GSH) є «ключовою цитозольною сульфгідрильною сполукою, яка діє як клітинний відновник і захисний агент проти АФК», оскільки саме його функція у мітохондріях стосується у першу чергу антиоксидантного захисту.

5. У аналізі і узагальненні результатів (с 88): автор зазначає, що аконітаза та параметри розвитку мух можуть бути надійними індикаторами токсичності, викликані НПН та іншими ...чинниками. Проте такий висновок повинен бути обґрунтований на основі диференційного аналізу результатів, інакше він носить суб'єктивний характер.

6. Аргумент про зменшення генерації АФК із зростанням споживання кисню мітохондріями, який використовує автор, не визначивши власне цього споживання та рівня АФК, запозичений з статті Balaban et al., Cell., 2005, Vol. 120, N. 4. – P. 483-495., проте у самій статті, доступній в інформаційних базах широкому загалу, обговорюються різні ситуації залежно від тиску кисню, кількості мітохондрій, тощо.

7. Посилання на роботи В. Halliwell, J.M.C. Gutteridge з некоректні: у посиланні № 5 не указуються реквізити монографії. Насправді – оригінальна робота (монографія, I видання): Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford; 346 p), а у Journal of Free Radicals in Biology & Medicine, Volume 1, Issue 4, 1985, Pages 331-332 Steven D. Aust опублікував рецензію на цю книгу (зазначене за параметрами: Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 10, N. 6.). Таке посилання невірне. Насправді у 2007 р вийшло 4-те видання монографії «Free radicals in biology and medicine / В. Halliwell, J.M.C. Gutteridge», цитованої близько 20 000 разів.

8. Зауваження до стилю і оформлення. На с. 59 зазначається, що у GS1,0, GS1,5 та GS4,0 групах рівень нітритів зростає аж у 1,7, 1,7 та 1,3 рази, а насправді - на порядок; С 72 - розрив речення рисунком; С 76-82 - що таке мкмоль/г.с.м.?; Табл 3.1 - розташована недоречно у матеріалі, присвяченому НПН, а в ній йдеться про фероціанід, у рисунках частково немає позначень вірогідності відхилень (рис. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**Б, табл 3.1, тощо).

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.
Дисертація відповідає вимогам МОН України. Результати проведених

автором досліджень повністю відображені у публікаціях. Зміст автореферату відображає структуру і положення дисертації, які виносяться на захист.

За темою дисертації опубліковано 10 наукових робіт, із яких 6 статей у виданнях, що затверджені ВАК України та зареєстровані у системі SCOPUS, у тому числі – 3 статті у виданнях із $IF > 1$, та 4 тези доповідей.

В цілому дисертація О.В. Лозінського є завершеною роботою, яку відзначає послідовність і цілеспрямованість у вирішенні конкретного питання біохімії – встановленні молекулярних механізмів протекторної дії протонифору 2,4-динітрофенолу за впливу прооксидантних чинників на дрозоділу на ранніх стадіях розвитку організму. Одержані результати відкривають нові можливості для з'ясування шляхів корекції окисного стресу протягом онтогенезу. Результати репрезентовані на достатній кількості наукових зібрань та у публікаціях належного рівня. Висновки відповідають поставленим завданням і повністю відображають одержані результати. Автореферат дисертації відповідає встановленим вимогам.

На основі вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота Лозінського Олександра Васильовича «Мітохондріальна складова системи антиоксидантного захисту *Drosophila melanogaster* та оцінка її ефективності за фізіологічними критеріями» за актуальністю проблеми, методичними підходами, зробленими висновками, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів є завершеною науковою працею і відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою N 526 Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 стосовно кандидатських дисертацій за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Професор кафедри хімії
та методики її навчання
Тернопільського національного
педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка,
доктор біологічних наук



О.Б. Столяр

20.10.2015 р.

Підпис: *Столяр О.Б.*
Засвідчує: *[Signature]*
Підпис: *[Signature]*