

ВІДГУК

офіційного опонента Тодосійчук Тетяни Сергіївни на дисертаційну роботу Войчука Сергія Івановича «Механізми дії стресових факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів», подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – Мікробіологія (09 – Біологія)

Актуальність теми дисертації. Мікробні клітини використовуються у багатьох сферах діяльності людини – для біосинтезу потрібних речовин, як основа біопрепаратів різного призначення, як модельні об'єкти тощо. Це обумовлює важливість вивчення їх властивостей та можливостей модифікації, а також удосконалення прийомів керування біосинтетичними процесами.

Мінливість мікроорганізмів додає значення таким дослідженням, а поява все нових факторів змін мікробних клітин робить ці дослідження вкрай актуальними. Можливість моделювання негативних впливів довкілля на мікробних клітинах відкриває й перспективи вирішення завдань в охороні здоров'я і природи. Тому, тема представленої дисертації Войчука Сергія Івановича, що спрямована на дослідження механізмів впливу стресових факторів на метаболічні процеси мікроорганізмів є своєчасною та актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана у відповідності з напрямками науково-дослідних робіт відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України «Молекулярно-генетичні та біохімічні шляхи реалізації ефектів синергетичної дії факторів фізичної природи на структурні компоненти КС та ЦПМ дріжджів» (2012–2016 роки), «Молочнокислі бактерії, актинобактерії, дріжджі: таксономічні дослідження, біологічні властивості та біосинтетична активність перспективних для промисловості штамів мікроорганізмів» (ДР №0109U002875, 2009-2013 рр.), «Різноманіття, фізіолого-біохімічні і генетичні властивості та біотехнологічний потенціал промислово-важливих штамів бактерій та дріжджів» (ДР №0114U000328, 2014-2018 рр.), «Фізіолого-біохімічні і молекулярно-генетичні властивості та механізми біологічної активності дріжджів, актинобактерій та молочно-кислих бактерій» (ДР №0119U002507, 2019-2013 рр.), а також в рамках програм та проєктів НАН України «Розробка наукових основ ефективних біотехнологій отримання рідких біопалив з органівмісних відходів із використанням наноматеріалів» (ДР №0115U004278, 2015-2019 рр.), «Сенсорна система на основі люмінесцентних бактерій для екологічного моніторингу радіочастотного електромагнітного випромінювання» (ДР №0118U005400, 2018-2022 рр.), «Моніторинг біотропних ефектів космічної погоди на клітинному рівні» (ДР №0115U005632, 2015 р.), «Основи направленої формування нових гібридних нанобіокомпозитів на основі бета-полісахаридів з набором заданих фізичних, хімічних і біологічних властивостей – високоперспективних наноструктурованих комплексів пребіотиків і синбіотиків для біомедицини і ветеринарії» (№ 04.49, 2012-2013

рр.), «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології» (№129, 2010-2012 рр.), «Методологічні підходи вивчення міжмолекулярної взаємодії модельних еукаріотичних мікроорганізмів» (№ 87-09/11-09, 2009 р.), «Розробка мікробіологічної сенсорної системи для аналізу впливу фізичних факторів відеодисплейних терміналів на користувачів» (2005-2006 рр.).

Наукова новизна роботи. Проведені здобувачем комплексні дослідження дозволили вперше теоретично обґрунтувати та експериментально підтвердити здатність неіонізуючого електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону (РЧ-ЕМВ) змінювати процеси синтезу компонентів клітинної стінки (КС), позаклітинного матриксу (ПКМ) і цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) дріжджів і впливати на чутливість мікроорганізмів до дії фізико-хімічних чинників стресу. Показано механізми та діапазон-залежні ефекти дії РЧ-ЕМВ, здатність змінювати рівні експресії генів та чинити цито- і генотоксичну дію, а також наслідки дії комплексу стресових факторів.

Вперше встановлено компоненти КС і ПКМ дріжджів, що мають вагоме значення для формування підвищеної осмотолерантності і механічної стійкості клітин – N-ацетилглюкозамін, N-ацетилгалактозаміну, нейрамінова кислота, білки і полісахариди, а також такі, що не мають визначальної ролі – ергостерол. Вперше показано, що поліфосфатази PPN1 і PPX1 залучені до процесів біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, адгезії клітин, до міжклітинної взаємодії, формування антибіотикостійкості, адаптивної і фенотипової відповіді, а також способи реалізації останньої.

Вперше запропоновано гіпотетичну модель модуляції синтезу компонентів КС, ПКМ та ЦПМ дріжджових клітин РЧ-ЕМВ.

Практичне значення одержаних результатів. В процесі виконання роботи автором запропоновано ряд нових підходів та методів вивчення, визначення, оцінки та виділення ряду сполук, а саме – виділення ДНК/РНК з клітин дріжджів, фотометричного напівкількісного визначення цукрів в складі ПКМ і КС методом мічених лектинів, швидкої кількісної оцінки фізіологічного стану популяцій культур клітин за фотометричними показниками при фарбуванні акридиновим помаранчевим.

Сконструйовано штами *S. cerevisiae* дефектні за поліфосфатазами PPN1 і PPX1, придатні для вивчення біологічної ролі цих ферментів та запропоновано модель впливу РЧ-ЕМВ на процеси синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, що пропонується для розробки методів керованого синтезу компонентів цих структур. Рекомендовано використання радіочастотного ЕМВ метрового-міліметрового діапазонів як засіб для надання стійкості мікроорганізмам до цито- і генотоксичних чинників, отримано патент на спосіб використання клітин дріжджів як сенсорних елементів для детектування біологічної дії неіонізуючого ЕМВ.

Зазначені практичні розробки використовуються у діяльності ряду наукових установ та закладів вищої освіти, що підтверджено відповідними, поданими у додатках дисертаційної роботи, актами впровадження.

Оцінка змісту дисертаційної роботи та її завершеності. Загальний обсяг дисертації становить 422 сторінки друкованого тексту і складається із «Вступу», розділів «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», 4 розділів результатів власних досліджень, а також «Узагальнення результатів дослідження», «Висновки» і «Додатки». Список використаних джерел містить 572 посилання, з яких 483 іноземних авторів. Дисертаційна робота містить 21 таблицю та 90 рисунків.

Завдання роботи сформульовані чітко і відповідають поставленій меті роботи. Об'єкт і предмет дослідження описані змістовно. У «Вступі» достатньо висвітлена актуальність роботи, а «Огляд літератури» свідчить про ґрунтовне опрацювання теми дисертантом та формування напрямку досліджень з урахуванням сучасного стану проблеми. Робота викладена гарною науковою мовою, а до позитивних особливостей можна віднести високу якість та одночасно інформативність представлених ілюстрацій – фотографій, рисунків тощо. Сформульовані в роботі основні результати і закономірності, які було отримано при проведених досліджень, в повній мірі відображено у висновках. Додатки містять характеристики штамів та матеріалів, використаних у роботі, характеристику схеми установки-випромінювача, детальних опис окремих методик, а також акти впровадження результатів досліджень.

Дисертаційна робота Войчука Сергія Івановича є завершеним науковим дослідженням, що має пріоритетне значення, наукову новизну та важливе теоретичне і практичне значення.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій. Достовірність та обґрунтованість отриманих результатів та висновків підтверджується використанням сучасних методів досліджень, статистичною обробкою експериментальних даних та аналізом закономірностей з врахуванням даних сучасної наукової літератури.

Для виконання поставлених завдань дисертантом використано комплекс сучасних методів досліджень: мікробіологічні, фізіолого-біохімічні, фізико-хімічні, біоінформатичні, молекулярно-генетичні, статистичні, методи мікроскопії та вивчення клітин за оптичними характеристиками і фізичними властивостями поверхні, методи аналізу цифрових зображень та інші. Вибрані методи дослідження відповідають поставленій меті і завданням роботи.

Наукові результати, висновки і практичне впровадження ґрунтуються на достатньому доказовому матеріалі, обсязі і високому методичному рівні дослідження. Статистична обробка даних проведена методами дисперсійного аналізу (factorial-ANOVA), пост-хок аналізу, багатофакторного планування, кластерного та кореляційного аналізу, аналізу часових ритмів і непараметричної статистика. Тому достовірність положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

Повнота викладення наукових положень, результатів і висновків роботи в опублікованих працях. Результати дисертаційної роботи повною мірою опубліковано у 83 наукових працях, з них 34 статі, у тому числі 26 у фахових виданнях, 23 у виданнях, що включені до міжнародних баз даних, 1 патент України на корисну модель, 1 монографія у співавторстві, 47 тез

доповідей. Теоретичні положення і результати дисертації ґрунтовно представлено та апробовано на науково-практичних конференціях.

Зміст автореферату в повній мірі відображує зміст дисертації. Висновки в авторефераті ідентичні висновкам та результатам дисертаційної роботи.

Питання і зауваження по дисертаційній роботі

1. В назві роботи та меті використано терміни «мікроорганізми», «клітини мікроорганізмів», однак переважна частина задач і проведені дослідження стосуються саме дріжджових клітин. Тому, бажано було в узгодити ці формулювання, оскільки навряд чи всі отримані залежності щодо дріжджів можна узагальнювати на інші типи мікробних клітин.

2. Оскільки у більшості досліджень використовувалися дріжджі, вирощені на оптимальному поживному середовищі (YEPD) до логарифмічної фази росту, то виникає питання, чи спостерігатимуться аналогічні реакції на стресові фактори у клітин іншого віку або що розвиваються у інших умовах?

3. У роботі рекомендовано використання радіочастотного ЕМВ метрового-міліметрового діапазонів як засіб для надання стійкості мікроорганізмам в агро- і біотехнологічній галузях, в галузі охорони довкілля тощо. Чи не обумовлюватиме це й підвищення антибіотикорезистентності патогенів, в тому числі й за рахунок можливого горизонтального переносу генів стійкості?

4. В окремих дослідженнях, результати яких подані на рис. 3.11, 3.12, у різних контекстах використовується термін «життєздатність» клітин, але не вказано його визначення. Тому, виникають сумніви, чи є це синонімом вживаних тут же термінів «стійкість» або зворотнім до «чутливість», а можливо значення на осі рис. 3.12. відповідають показнику кількості КУО.

5. У Висновках, на жаль, не наведені кількісні/чисельні характеристики результатів досліджень (наприклад, відповідність отриманих ефектів певній дозі опромінювання, вміст жирних кислот, визначальний для формування стійкості клітин), що не лише б додало інформативності, а й мало б бути основою для розробки згаданих у роботі методів керованого синтезу компонентів відповідних клітинних структур.

6. Цікаво було б уточнити перспективи використання результатів дослідження впливу гео-космічних факторів на величину питомої швидкості росту дріжджів?

7. Запропонована автором гіпотетична модель модуляції синтезу компонентів КС, ПКМ та ЦПМ дріжджових клітин РЧ-ЕМВ у різних частинах роботи (п.7.1, практичне значення, тощо) має дещо різну назву, а у висновках чомусь взагалі не згадується (як виконане завдання №7).

Однак, зазначені зауваження стосуються переважно представлення результатів і не знижують наукової і практичної цінності дисертаційної роботи, яка виконана на високому науково-методичному рівні, з використанням сучасних методів дослідження.

Висновок

Дисертаційна робота Войчука Сергія Івановича «Механізми дії стресових факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів» є завершеним науковим дослідженням, виконаним на високому методичному та науковому рівні, що за актуальністю, змістом, обсягом, науковою новизною, практичним значенням одержаних результатів, оформленням повністю відповідає вимогам п. 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Войчук Сергій Іванович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – Мікробіологія (09 – Біологія).

Завідувач кафедри
промислової біотехнології
КПІ ім. Ігоря Сікорського, д.т.н., доц.

